UNTERSUCHUNG ZUR HORMONABHÄNGIGKEIT DES MEMBRANTRANSPORTS

VON K^+, Na^+ UND Cl^- BEI ZELLKULTUREN VON PETROSELINUM

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HELMUT PFRÜNER

aus Reutlingen - Sondelfingen

1977

77 275

UNTERSUCHUNG ZUR HORMONABHÄNGIGKEIT DES MEMBRANTRANSPORTS VON K^+, Na^+ UND Cl^- BEI ZELLKULTUREN VON PETROSELINUM

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HELMUT PFRÜNER

aus Reutlingen - Sondelfingen

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	13. Januar 1977
Dekan:	Prof. Dr. D. Ammermann
1. Berichterstatter	Prof. Dr. F. W. Bentrup
2. Berichterstatter	Prof. Dr. A. Hager

Gesamtherstellung: aKu–Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.0.	Einleitung	1
2.0.	Material und Methoden	4
2.1.	Symbole und Abkürzungen, Dimensionen	4
2.1.1.	Nährmedien und Puffer	7
2.1.1.1.	Modifiziertes Medium nach MURASHIGE & SKOOG (1962)	7
2.1.1.2.	Medium für Aufnahme- und Efflux-messungen	7
2.1.1.3.	Waschpuffer für Aufnahmekinetiken ..	8
2.1.2.	Radionuklide und Szintillations-chemikalien	8
2.1.3.	Chemikalien	10
2.2.	Kulturbedingungen	11
2.2.1.	Pflanzenmaterial und Kulturmedium ..	11
2.2.2.	Kulturanlage	12
2.2.3.	Inoculation	12
2.2.3.1.	Kalluskulturen	13
2.3.	Quantitative Daten über den Kultur-verlauf	14
2.3.1.	Bestimmungen des Frisch- und Trok-kengewichts	14
2.3.2.	Bestimmungen der Zellzahl pro ml Suspension	14
2.3.3.	Bestimmungen der Leitfähigkeit und des pH des Mediums	14

		Seite
2.3.4.	Messungen des Sauerstoffverbrauchs der Suspensionen	15
2.3.5.	Ionengehalte des konditionierten Mediums	15
2.3.6.	Bestimmung der intrazellulären Ionenkonzentrationen	15
2.3.6.1.	Bestimmung des extrazellulären Raums .	16
2.3.6.2.	Intrazelluläre Ionenkonzentrationen ..	17
2.3.6.3.	Schema der Probenaufbereitung	17
2.3.7.	Analytische Messungen der Ionengehalte	18
2.3.7.1.	Atomabsorptions-Spektrophotometrie von K^+ und Na^+.....	18
2.3.7.2.	Eichlösungen und Eichkurven	18
2.3.8.	Bestimmung des Chlorid- und des Ammoniumgehalts	19
2.3.8.1.	Chloridgehalt	19
2.3.8.2.	Photometrische Ammoniumbestimmung	20
2.3.9.	Korrektur der Ionengehalte des Mediums	20
2.4.	Aufnahme von Ionen, Substraten und Phytohormonen	21
2.4.1.	Kriterien der Zellsuspensionen für Experimente	21
2.4.2.	Nährmedium für Aufnahme- und Effluxversuche	21
2.4.3.	Standardbedingungen für die Äquilibration und Inkubation	22

		Seite
2.4.3.1.	Aquilibration	22
2.4.3.2.	Probennahme der inkubierten Suspensionen	23
2.4.3.3.	Aufschluß der Proben	23
2.4.4.	Flüssigszintillationsmeßtechnik bei Aufnahmeexperimenten	24
2.4.4.1.	Geräte und Szintillationsmischungen	24
2.4.4.2.	Messung der Proben	25
2.4.4.3.	Eigenschaften der Szintillationsmischungen	25
2.4.4.4.	Quenchkorrekturmethoden	26
2.4.4.5.	Meßtechnische und rechnerische Trennung bei Mehrfachmarkierungen	27
2.5.	Effluxmessungen	27
2.5.1.	Entnahme von Zellen unter halbsterilen Bedingungen	27
2.5.2.	Äquilibrations- und Inkubationsbedingungen	28
2.5.3.	Methodik der Effluxversuche	29
2.5.4.	Probenaufbereitung für Messungen der Radioaktivität	30
2.5.4.1.	Wässrige Proben	30
2.5.4.2.	Zellproben	31
2.5.5.	Meßtechnik für Effluxproben	31
2.5.5.1.	Quenchkorrekturmethoden	31
2.5.5.2.	Messungen von Mehrfachmarkierungen	31
2.6.	Auswertung der Effluxdaten	33
2.6.1.	Kompartmentanalyse	33

		Seite
2.6.2.	Berechnung von Q_v	35
2.6.3.	Graphisch-numerische Auswertung	35
2.6.4.	Regressionsanalysen	37
3.0.	Ergebnisse	38
3.1.	Quantitative Daten über den Kulturverlauf	38
3.1.1.	Beschreibung der Suspensionskulturen ...	38
3.1.2.	Wachstumsverlauf einer Kultur	41
3.1.3.	PH des Mediums	41
3.1.4.	Leitfähigkeitswerte des Mediums	43
3.1.5.	Messungen der Sauerstoffverbrauchsrate .	43
3.1.6.	Bestimmung der Zellzahl/ml und Anteil "hyaliner" Zellen an der Gesamtpopulation	44
3.1.7.	Ionengehalte des Mediums	47
3.1.8.	Intrazelluläre Ionengehalte von K^+, Na^+ und Cl^-	47
3.2.	Aufnahmekinetiken von IAA (^{3}H-IAA)	52
3.2.1.	Zeitabhängige Aufnahme von IAA (^{3}H-IAA)	52
3.2.2.	Abhängigkeit der IAA-Aufnahmerate von der IAA-Außenkonzentration	52
3.3.	Aufnahmeraten von K^+ (^{86}Rb), Na^+ (^{22}Na) und Cl^- (^{36}Cl)	54
3.3.1.	Abhängigkeit der Cl^--Aufnahme von der NO_3^-- und NH_4^+-Konzentration des Mediums .	54
3.3.2.	Abhängigkeit der Cl^--Aufnahme von der Cl^--Außenkonzentration	56

		Seite
3.3.3.	Abhängigkeit der Cl^--Aufnahme vom pH des Mediums	57
3.3.4.	Lag-Phase der Hormonwirkung auf Ionenflüsse	60
3.3.5.	Abhängigkeit der Ionenaufnahme von der IAA-Konzentration	62
3.4.	Wirkung der 2,4-D auf die IAA- und Ionenaufnahme	63
3.4.1.	Wirkung der 2,4-D auf die IAA-Aufnahmerate	63
3.4.2.	Abhängigkeit der Cl^--Aufnahme von der 2,4-D-Konzentration	64
3.4.3.	Lag-Phase der 2,4-D-Wirkung auf die Ionenaufnahme	64
4.0.	Kompartmentanalyse	65
4.1.	Einfluß der Inkubationsdauer von Nukliden und Hormonen auf die Effluxraten	65
4.2.	Dosis-Effekt-Beziehung für IAA-abhängige Plasmalemmaflüsse von K^+ und Cl^-	71
4.3.	Übergangseffekte von Phytohormonen auf Flüsse am Plasmalemma und Tonoplast	73
4.4.	Wirkung von Auxinanaloga und Hemmstoffen der Auxinwirkung auf Flüsse von K^+, Na^+ und Cl^-	79
4.5.	Stoffwechselabhängigkeit der Phytohormonwirkungen	80
5.0.	Diskussion	82
5.1.	Influx- und Effluxraten der IAA	82
5.1.1.	Aufnahme der IAA	82
5.1.2.	Effluxraten der IAA	85

		Seite
5.1.3.	Vergleich der Influx- und Effluxdaten ..	87
5.2.	Gültigkeit der Kompartmentanalyse (3 Kompartimente in Serie) für Suspensionszellen	88
5.3.	Kompartmentanalyse im quasi-steady state	90
5.4.	Vergleich Influx- und Effluxmessungen .	93
5.5.	Wirkung von Phytohormonen auf Ionenflüsse	99
5.6.	Aktive und passive Transportprozesse ..	100
5.6.1.	Berechnung der Fluxquotienten nach USSING und TEORELL	100
5.6.2.	Berechnung der Permeabilitätskoeffizienten und der relativen Permeabilitäten für K^+, Na^+ und Cl^-	104
5.6.3.	Spezifische Wirkung der Phytohormone auf Ionentransporte	107
5.7.	Mögliche Mechanismen der spezifischen Phytohormonwirkung auf den Ionentransport	108
5.7.1.	Stimulierung der membrangebundenen Kationen-ATPasen durch Phytohormone ...	108
5.7.2.	Veränderungen der elektrischen Eigenschaften und/oder der Struktur der Membran	112
6.0.	Zusammenfassung	114
7.0.	Literaturverzeichnis	117
8.0.	Lebenslauf	125

1. Einleitung

Vor etwa 50 Jahren führte WENT den Begriff AUXIN in die Biologie ein, vor etwa 40 Jahren wurde Auxin von KÖGL chemisch charakterisiert. Seither wurde in vielen physiologischen, entwicklungsphysiologischen und biochemischen Untersuchungen eine Vielzahl von Auxineffekten beschrieben, aber es gibt noch keine allgemein gültige Vorstellung über die Primärwirkung des Auxins. Auxine bewirken zum Beispiel eine erhöhte Plastizität und Extension der Zellwand, eine erhöhte Zellwandsynthese, ein Streckungswachstum der Koleoptilen, eine Protonenextrusion, eine erhöhte RNA- und Enzymsynthese bis hin zu so komplexen Vorgängen wie erhöhte Proliferationsraten und Differenzierung von Pflanzenzellen. Aus den Untersuchungen kristallisierte sich heraus, daß zwischen schnellen und langfristigen Auxineffekten unterschieden werden muß und daß der primäre Wirkort schneller Prozesse wahrscheinlich in der Zellwand, im Plasmalemma und/oder im Cytoplasma liegt.

In den letzten Jahren wurde in den Arbeitsgruppen von HAGER (säureinduziertes Wachstum), RAYLE, CLELAND und MARRÉ ein Zusammenhang zwischen elektrochemischen und biochemischen Primärprozessen bei schnellen Auxinwirkungen gefunden:

IAA induziert eine Protonensekretion in die Zellwand (HAGER, 1971, RAYLE, 1973, CLELAND, 1976), in der Folge wird die Zellstreckung, eine stöchiometrische K^+-Aufnahme und die Malatakkumulation (HASCHKE u. LÜTTGE, 1975) stimuliert. Hinweise sprechen dafür, daß Auxine membrangebundene ATP-asen anregen kön-

nen und schnelle energieverbrauchende, ionenregulatorische Vorgänge in Gang setzen, die langfristig durch stöchiometrische Malatsynthese (HASCHKE u. LÜTTGE, 1976) balanciert werden. Aus Untersuchungen über den polaren Auxintransport, die Wirkung von Auxinhemmstoffen schloß HERTEL auf membrangebundene "Auxinrezeptoren", deren Bindungskonstanten berechnet werden können. Er stellte in einem spezifischen Bindungstest (HERTEL, 1974) eine plasmamembran-gebundene Auxinbindung (bzw. von Auxinanaloga) fest, die qualitativ und quantitativ im Einklang mit physiologischen Untersuchungen steht.
Bisher weniger geachtet wurde auf Veränderungen von Ionentransportprozessen und der Osmoregulation, sowie auf Übergangspotentialveränderungen als Folge einer schnellen Auxinwirkung. Sehr wahrscheinlich bewirken Auxine spezifische Änderungen der Permeabilität bzw. Leitfähigkeit (GUTKNECHT, 1976) für bestimmte Ionen. Weitergehende Deutungen dieser Vorgänge über Mechanismen, wie z.B. Bildung von "Membranporen" (LÄUGER, 1973) oder ionophore Wirkung von Auxinen (PRESSMAN, 1973) sollten vorerst zurückgestellt werden.

In der folgenden Untersuchung werden an axenischen, entdifferenzierten Suspensionskulturen von PETROSELINUM schnelle Auxineffekte auf Ionenflüsse von K^+, Na^+ und Cl^- nachgewiesen und versucht, die Auxinwirkungen in der Zelle zu lokalisieren. Diesem Objekt mangeln die geltenden Kriterien von Auxinwirkungen bei üblichen Standardobjekten wie z.B. polarer Transport, Zellstreckung, säureinduziertes Wachstum,

es müssen daher andere Kriterien für schnelle Auxineffekte gefunden werden. Diesen Nachteilen stehen aber folgende Vorteile gegenüber: Heterotrophie, Zellsuspension, steuerbarer Metabolismus, hohe IAA- und Ionenaufnahmeraten und hohe Ionenaustauschraten.

Problemstellungen:

- Berechnung von Ionentransportraten von K^+, Na^+, Cl^- und Kompartmentanalysen unter quasi-steady state und dem non-steady state bei Auxinwirkung (IAA, 2,4-D),
- Lokalisierung der schnellen Auxineffekte an pflanzlichen Membranen und Abhängigkeit dieser Effekte von der Hormoneinwirkungsdauer,
- Berechnung von aktiven und passiven Komponenten an den Ionenflüssen und von differenzierten Wirkungen der Auxine (IAA, 2,4-D) auf Flüsse von K^+, Na^+ und Cl^-.

Problemlösungen:

- Untersuchungen über den Kulturverlauf und Bestimmung von Parametern bei einer diskontinuierlichen Kulturmethode um die experimentellen Bedingungen zu standardisieren,
- Messung von schnellen Auxineffekten auf die Aufnahme- und Auswaschkinetiken von IAA, K^+, Na^+ und Cl^- mit Hilfe von Radionuklid-Mehrfachmarkierungen,
- verbesserte experimentelle Bedingungen bei Effluxversuchen besonders für Suspensionskulturen und eine genauere Berechnungsmethode für eine Kompartmentanalyse um eine differenzierte Wirkung von Auxinen und Übergangsphasen zu messen.

2.0. Material und Methoden

2.1. Symbole und Abkürzungen, Dimensionen

Symbol	Bezeichnung	Dimension
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	
3,5-D	3,5-Dichlorphenoxyessigsäure	
IAA	ß-Indolessigsäure	
∝-NAA	Naphthyl-1-essigsäure	
ß-NAA	Naphthyl-2-essigsäure	
NPA	1-N-Naphthylphthalamidsäure	
TIBA	2,3,5-Trijodbenzoesäure	
"TX 100"	Szintillationsmischungen für	
"TX 114"	Flüssigszintillationsmessungen	
	siehe unter 2.1.2.	
a_j	elektrochemische Aktivität eines Ions j	mM
AFS	apparent free space	
c_j	Konzentration eines Ions j	mM oder mol m^{-3}
cpm	counts per minute, gemessene Zerfälle einer radioaktiven Substanz	
dpm	decays per minute	1 Ci = $3,7 \times 10^{-10}$ Zerfälle s^{-1}
E_m	Potentialdifferenz über einer Membran	mV

		Dimension
F	Faradaykonstante	96490 C mol^{-1}
FW	Frischgewicht	g
g_j	Membranleitfähigkeit für ein Ion j	S m^{-2}
HWT	Halbwertszeit für radioaktiven Zerfall	s
I	apparenter Ionengehalt zur Zeit t = 0	mol/mg TW
J_{in}, J_{ex}	Nettoflüsse von Ionen	mol cm^{-2} s^{-1}
k	Reaktionskonstante (Reaktion 1. Ordnung)	s^{-1}
P_j	Permeabilität eines Ions j	m s^{-1}
Q	Quantität einer Substanz in einem Kompartiment	mol
Q^*	Quantität eines Isotops	
r	Bestimmtheitsmaß bei einer Regressionsanalyse	
R	Gaskonstante	8,31 J mol^{-1} K^{-1}
S, S^*	Spezifische Radioaktivität im Kompartiment	cpm bzw. dpm mol^{-1} s^{-1}
T	Temperatur	^oC , K ,
TW	Trockengewicht	g
t	Zeit	
t_{in}	Auflagedezeit mit Radionukliden	s
V	Vakuole	
z	elektrochemische Wertigkeit eines Ions	
φ	unidirektionaler Fluß mit Subscripten, die die Flußrichtung anzeigen	mol cm^{-2} s^{-1}
Φ^*	Netto-Traceraufnahme bzw.-abgabe, Subscript in = Aufn. ex = Efflux	

Subscripte

c	cytoplasmatisch
ex	nach außen gerichtet, zumeist Nettoefflux
i	innen
in	Nettoinflux
j	Ionenspezies , z.B. bei P_K,
o	außen
T	total, beispielsweise Q_T,
v	zur Vakuole gehörend
φ_{co}	unidirektionaler Fluß Cytoplasma nach außen,
φ_{cv}	unidirektionaler Fluß Cytoplasma zur Vakuole,

Präfixe

p	10^{-12}
n	10^{-9}
μ	10^{-6}
m	10^{-3}

Es wurden die in der Physik und in der physikalischen Chemie üblichen Einheiten und Beschreibungen verwendet.

2.1.1. Nährmedien und Puffer

2.1.1.1. Modifiziertes Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962)

Die Komponenten dieses Mediums sind bei SEITZ (1970) und GUTKNECHT (1976) angegeben. Zeitweilig wurde versucht, PETROSELINUM-Suspensionskulturen in dem von GAMBORG et al., (1968) und von HAHLBROCK (1975) angegebenen Medium (B 5 Medium) zu kultivieren.

2.1.1.2. Medium für Aufnahme- und Effluxmessungen

In Tab. 1 sind die Komponenten eines vereinfachten Nährmediums für Aufnahme- und Effluxmessungen angegeben, im folgenden wird dieses Medium "Experimentalmedium" genannt.

Tab. 1 Komponenten des Experimentalmediums (in mM)

Substrate			Glucose	15
			Mannitol	75
			meso-Inositol	0,1 g/l
Ionen	K^+	20	Cl^-	6
	Na^+	0,22	PO_4^{3-}	5
	Ca^{2+}	3,0	SO_4^{2-}	1,5
	Mg^{2+}	1,5	NO_3^-	20
	Fe^{3+}	0,01	EDTA	0,1 - 0,05
	NH_4^+	20	Citrat	5
			Maleat	1

Das Medium wurde mit H_3PO_4 auf pH 4,7 - 4,8 eingestelt, sterilfiltriert und im Kühlraum aufbewahrt.

2.1.1.3. Waschpuffer für Aufnahmekinetiken

Der Puffer (pH 4,7 - 4,9) setzt sich zusammen aus

Citronensäure	25 mM
NaH_2PO_4	50 mM,

zum Auswaschen der im AFS anhaftenden Radionuklide wurde der Puffer auf + 4 °C gekühlt.

2.1.2. Radionuklide und Szintillationschemikalien

^{3}H-IAA (äthanolische Lösung, spezifische Aktivität 29 Ci/mmol) wurde von ISOTOPEN-DIENST WEST GMBH (Hersteller CEA, France) gekauft, alle anderen aufgeführten Nuklide über Firma AMERSHAM BUCHLER GmbH & Co, KG, Braunschweig geliefert.

^{86}Rb	spezifische Aktivität	2 - 10	mCi/mg Rb^+
^{22}Na	"	>100	mCi/mg Na^+
^{36}Cl	"	3	mCi/g Cl^-
(als 0,1 - 0,3 M HCl)			
^{3}H-Inulin	spezifische Aktivität	300	mCi/mmol
^{14}C-6-Glucose	spezif. Aktivität	45	mCi/mmol

^{22}Na wurde freundlicherweise von Doz. Dr. Altendorf, Universität Tübingen, Institut für Mikrobiologie II, zur Verfügung gestellt.

Alle verwendeten Szintillationschemikalien (p.A.) stammten von der Firma E. MERCK AG, Darmstadt.

Bei Aufnahme- und Effluxversuchen wurden diese 5 Szintillationsflüssigkeiten verwendet:

a) eine Mischung aus Xylol - Triton X-114 (25 %) und PPO 3,5 g/Dimethyl-POPOP 0,3 g nach ANDERSON und McCLURE (1973), die Konzentration der festen Szintillatoren PPO und POPOP richtet sich nach der β^--Aktivität des Nuklids.

b) eine speziell für Effluxmessungen entwickelte Mischung aus (Angaben pro l):

Xylol	600	ml	Äthanol abs.	110	ml
Triton X-100 bzw. Triton X-114	250	ml	Äthylenglykol	40	ml
			PPO	3 - 3,5	g
			Dimethyl-POPOP	0,3	g

Die Konzentrationen von PPO und DM-POPOP variieren je nach der β^--Maximalenergie der Nuklide.

c) UNISOLVE - ein Universalszintillator besonders für wässrige Salzlösungen über Firma W. ZINSSER, Frankfurt.

d) INSTA GEL - ein Universalszintillator der Firma PACKARD INSTRUMENT GmbH, Frankfurt.

2.1.3. Chemikalien

Aminosäuren, Phytohormone von der Firma E. MERCK, Darmstadt und von der Firma SERVA INTERNATIONAL GmbH & Co., Heidelberg,

NAA von der Firma FLUKA AG, Buchs,

Triton X-100, Triton-X-144 über SERVA INTERNATIONAL;

folgende Substanzen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

PROF. Dr. R. HERTEL, Freiburg, NPA und TIBA,

Dr. K. LÜRSSEN, Firma BAYER AG, Leverkusen
3,5-D und Naphthoxyessigsäure,

Firma CIBA-GEIGY, Basel, Derivate der 2,4-D und von
Naphthoxyessigsäuren,

Prof. Dr. A. BALLIO, Neapel, für Vorversuche Fusicoccin.

Alle übrigen Chemikalien stammten von der Firma E. MERCK AG.

2.2. Kulturbedingungen

2.2.1. Pflanzenmaterial und Kulturmedium

Gewebezellen von Petroselinum sativum (Hofm.) wurden ursprünglich aus einem Wurzelkallus isoliert und seit 1968 als sterile Suspensionen inoculiert und kultiviert in einem von SEITZ (1970) modifizierten vollsynthetischen Medium. Stammkulturen wurden von Dr. U. Seitz, Institut für Biologie I, Tübingen, freundlicherweise für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Die Komponenten des modifizierten MURASHIGE & SKOOG-Mediums (MURASHIGE u. SKOOG, 1962) sind bei SEITZ (1970) und GUTKNECHT (1976) angegeben. Stammlösungen (hundertfach konzentriert) der Vitamine, Spurenelemente, Aminosäuren, von Kinetin und 2,4-D wurden bei - 20 °C eingefroren und vor dem Ansetzen des Mediums auf Zimmertemperatur erwärmt. Das Medium wurde auf pH 5.5 eingestellt und bei 115 °C (1,o - 1,1 bar) 15 min autoklaviert.

Ab März 1975 wurden nur 3 - 4 Wochen alte Stammlösungen (Salze, Vitamine, Spurenelemente, Aminosäuren, Kinetin) und Hormone als frisch angesetzte Lösungen verwendet, das pH mit H_3PO_4 auf 4.9 bzw. 5.5 eingestellt.In der "clean bench" (FLOW Laboratories, Bonn) wurde die Nährlösung unter Überdruck (1 - 1,3 bar) sterilfiltriert [SARTORIUS Edelstahlfiltrationsgerät SM 16225 5o mm Ø mit WHATMAN C Vorfilter 45 mm Ø und SM 111o3 bzw. 113o2 (47/5o mm Ø) Sterilfilter] und in 25o - 1000 ml SOVIREL-Flaschen (SOVIREL-FRANCE, Paris) abgefüllt und im Kühlraum aufbewahrt. Vor Neuinoculationen wurde den Nährlösungen ein entsprechendes Volumen steriler IAA-Lösung zugegeben (Endmolarität 10^{-5} M/l).

2.2.2. Kulturanlage

Die Suspensionen wurden in 80 - 100 ml Algenanzuchtröhren belüftet, zur Überbrückung wurden Suspensionen in 250 - 500 ml Weithals-Erlenmeyerkolben mit 2 bis 4 Einstichen bei 120 - 150 rpm im Reziprokschüttler kultiviert. Alle Kulturen wurden im Dauerdunkel, bei 24 - 27 °C und 5o - 65 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

Ein regulierbarer Aquarienbelüfter (WISA Mod. 300) versorgte über Vorfilter, Waschflasche, Sterilfilter (SM 11102) die Algenanzuchtröhren mit Luft, deren Zufuhr über Quetsch- und Kunststoffhähne je nach Dichte der Suspension und Volumen der Röhren angepaßt werden konnte.

Die SARTORIUS-Filtrationsvorsätze SM 16517 bzw. 16514 mit SM 11102 Sterilfilter wurden mit den Kulturröhren bei 115 °C, 1,o - 1,2 bar, 15 min autoklaviert. Nach einer Kulturperiode wurden die Röhren 36 h im Chrom-Schwefelsäurebad entkeimt und gesäubert, anschließend etwa 24 h in aqua dest. gewässert.

2.2.3. Inoculation

Folgende Kriterien mußten für eine Neuinoculation bzw. Subkultivierung von Suspensionen erfüllt sein:

- homogene Gestalt der Zellen, etwa 35 µm Durchmesser,
- ein Anteil von mindestens 40 % von "hyalinen" und proliferierenden Zellen an der Population,
- überwiegend Zellaggregate mit 4 - 8 Zellen,
- helle, gut sedimentierbare Suspension, klarer Überstand ohne kristalline Strukturen und Partikel.

In der Regel wurde im Abstand von 6 - 10 Tagen (je nach Dichte der Suspensionen in der logarithmischen oder stationären Wachstumsphase) neu inoculiert. Das konditionierte Medium wurde im Verhältnis 1:2 bis 1:4 mit frischem Medium verdünnt, dieses Verhältnis garantierte erfahrungsgemäß optimales Wachstum und einen hohen Anteil proliferierender Zellen. Die neu inoculierte Suspension hatte eine Zelldichte von 300 000 bis 600 000 Zellen pro ml Suspension in der logarithmischen Wachstumsphase und bis 1 - 1,5 Millionen Zellen/ml Suspension bei älteren Kulturen in der stationären Wachstumsphase.
Der Medientausch unter sterilen Bedingungen dauerte 2o - 3o min, Sauerstoffverbrauchsmessungen ergaben, daß nach dieser Zeit unter anaeroben Bedingungen Schädigungen der Zellsuspensionen eintraten (geringere Proliferationsrate, längere lag-Phase des Wachstums).

2.2.3.1. Kalluskulturen

Die Komponenten des Nährbodens sind bei SEITZ (1970) angegeben. Das flüssige Agarmedium wurde in 250 - 300 ml Weithals-Erlenmeyerkolben abgefüllt und erst nach einer Kontrolle auf Sterilität der Kallus inoculiert. In der Regel wurde alle 1 bis 2 Monate überimpft. Kalluskulturen (durch Plattieren von Suspensionen) dienten als Test für mikrobielle Kontamination bzw. für Reinheit der Kulturen.

2.3. Quantitative Daten über den Kulturverlauf

2.3.1. Bestimmungen des Frisch- und Trockengewichts

Aliquots der Suspensionen wurden auf Nylonfilter (15 - 20 µm Maschenweite) vorsichtig binnen 20 - 30 s abgenutscht, der feuchte Zellkuchen wurde abgespatelt und gewogen.
Für Trockengewichtsbestimmungen wurde der Zellkuchen auf dem Nylonfilter gelassen und 24 - 36 h im Gefriertrockner (CHRIST Delta IA) getrocknet.

2.3.2. Bestimmungen der Zellzahl pro ml Suspension

Etwa 3 - 5 min wurden die größeren Zellaggregate der Proben mit dem Whirlmix (CENCO Instrum., Breda) oder mit einem Magnetrührer zerkleinert. Verdünnte aliquots wurden in der FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammer (200 µm Schichttiefe) gezählt (Mittelwerte aus mindestens 6 Messungen).

2.3.3. Bestimmungen der Leitfähigkeit und des pH des Mediums

Das zellfreie, konditionierte Medium wurde mit einer Peristaltikpumpe (LKB ReCyChrom 4912A) durch eine Leitfähigkeitsmeßzelle gepumpt (LKB 5311B und LKB Conductolyzer 5300 B). Thermokonstanz des Wasserbads von 23 °C wurde eingehalten.
Anschließend wurde der Wert des pH mit einer INGOLD-Elektrode bestimmt.

2.3.4. Messungen des Sauerstoffverbrauchs der Suspensionen

Die Sauerstoffverbrauchsrate von Zellsuspensionen (z.B. Test von Medien, Hormonen, Äquilibrationsbedingungen auf kurzzeitige Stoffwechselprozesse) wurde mit der CLARK-Oxygen-Elektrode (Firma RANK Brothers, Cambridge, U.K.) bestimmt. Die Suspension wird mit gleichbleibender Drehzahl gerührt, während der Messung können Lösungen eingespritzt werden. Die Meßtemperatur betrug $22{,}5 \pm 0.5\ ^{o}C$, der Sauerstoffpartialdruck schwankte dadurch um 2,3 %. Puffer und Medien hatten einen höheren Sauerstoffpartialdruck als aqua dest., daher wurde abgestandenes aqua dest. als Standard genommen. Die Äquilibrationsbedingungen für die Sauerstoffverbrauchsmessungen entsprechen den angegebenen Bedingungen.

2.3.5. Ionengehalt des konditionierten Mediums

Von verschiedenen Inocula wurden zellfreie Proben entnommen und bis zur Ionenbestimmung eingefroren, Kriterien: keine mikrobielle Kontamination und keine Partikel oder kristallinen Strukturen im Überstand.

2.3.6. Bestimmung der intrazellulären Ionenkonzentrationen

Die von SCHULTZ und SOLOMON (1961), vgl. ZIMMERMANN und PILWAT (1971) und KANNE (1974), vorgeschlagene Methode der intrazellularen Ionenbestimmung ist bei heterotrophen Suspensionen von Mikroorganismen zuverlässig und die Methode der Wahl. Notwendige Voraussetzungen für dieses Vorgehen sind konstante experimentelle Bedingungen.

2.3.6.1. Bestimmung des extrazellulären Raums

Der Ionengehalt des den Zellen anhaftenden Mediums wird berechnet und die gemessene Innenkonzentration korrigiert, eine Ionenadsorption im Donnan free space wird nicht berücksichtigt. Inulin wird von pflanzlichen Zellen nicht metabolisiert und nur geringfügig durch Diffusion aufgenommen. Inulin (^{3}H-Inulin, Aktivität 200 000 dpm/ml Suspension) wird unter Schütteln bzw. Belüften 3o min äquilibriert, die Suspension bei 20 000 g, 1o min abzentrifugiert (SORVALL RC), der Überstand mit einer Spritze abgehoben und das Restmedium mit einer sehr feinen Kanüle abgesaugt. Dekantieren des Überstands führte zu unzuverlässigen Werten, denn die Sedimentation der Zellen hängt von ihrer Kulturdauer ab.

Radioaktive Proben des Überstands wurden mit Szintillationsflüssigkeit(TX 1oo oder TX 114 Szintillationsflüssigkeit) versetzt, gezählt und cpm auf dpm korrigiert. Die Zellen wurden mit 0.5 ml DIGESTIN und 1 ml Methanol etwa 1o - 14 h aufgeschlossen, Szintillationsflüssigkeit hinzupipettiert und cpm auf dpm korrigiert.

Der extrazelluläre Raum (ER) errechnet sich nach:

$$\text{ER (ml/g FW)} = \frac{\text{dpm/g Frischgewicht}}{\text{dpm/ml Überstand}} \qquad (1)$$

2.3.6.2. Intrazelluläre Ionenkonzentrationen

SCHULTZ und SOLOMON (1961) gaben diese Rechenvorschrift an:

$$K_i = \frac{K_m - (FW \times ER \times K_o)}{FW \times (1 - ER) - TW} \qquad (2)$$

wobei: K_i = intrazelluläre Ionenkonzentration in mM intrazellulärem Wasser,

K_o = korrigierte Ionenkonzentration des Mediums in mM

K_m = gemessene intrazelluläre Ionenkonzentration in 10^{-6} mol,

TW = Trockengewicht in g,

FW = Frischgewicht in g,

ER = extrazellulärer Raum in ml/g FW.

2.3.6.3. Schema der Probenaufbereitung

Der Zellkuchen (TW) wurde in einem KJEHLDAHL-Quarzkolben mit etwa 2 - 4 ml (je nach TW) HNO_3-SUPRAPUR versetzt, auf einem elektrischen Heizofen für Aufschlüsse auf Stufe 1 - 2 etwa 30 - 60 min erhitzt bis die Zellen digeriert waren und eine klare Flüssigkeit übrigblieb.

In einer Abänderung wurde der Zellkuchen in einem Polyäthylenröhrchen mit 2 -3 ml HNO_3-SUPRAPUR versetzt und im Wasserbad bei 100 °C bis zur völligen Digestion erhitzt. Das Restvolumen wurde gemessen, für Ionenbestimmungen wurden davon aliquots entnommen.

2.3.7. Analytische Messungen der Ionengehalte

2.3.7.1. Atomabsorptions-Spektrophotometrie von K^+ und Na^+

Die Ionenaktivitäten von K^+ und Na^+ der Nährlösungen und der Zellen wurden mit einem Flammenspektralphotometer für Absorptions- und Emissionsanalyse FA2/PMQ III (Firma ZEISS AG, Unterkochen) gemessen und über einen TE-Wandler auf einen Einkanal-Flachschreiber (SERVOGOR) übertragen. Die Spektrallinien der "HOLLOW"-Lampe wurden für K^+ bzw. Na^+ nach Vorschrift eingestellt.

Die wässrige Probe (100 - 200 µl) wurde in einer Zerstäuberkammer in einem Propangas-Luftgemisch verbrannt. Die thermisch angeregten K^+- bzw. Na^+-Atome gelangen in den Strahlengang der "HOLLOW"-Lampe (für K^+ bzw. Na^+) mit einem charakteristischem Spektrum. K^+- bzw. Na^+-Atome absorbieren einen Teil des emittierten Lichts, die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge ist ein Maß für die Aktivität der Ionen in der Probe.

2.3.7.2. Eichlösungen und Eichkurven

KCl p.a. wurde 1 h bei 100 °C getrocknet, mit aqua bidest. 0.1 bis 0.01 N Lösungen angesetzt und je nach Meßbereich bzw. Meßempfindlichkeit entsprechend verdünnt. Für Na^+ gilt ein entsprechendes Vorgehen.

Aliquots der Eichlösungen wurden in die Zerstäuberkammer einpipettiert, zuverlässige Werte wurden für Lösungen von 0.01 bis 0.3 mM sowohl für K^+ als auch für Na^+ erhalten. Für Eichkurven wurde der Schreiberausschlag in mm gegen die

Normalität der Lösungen aufgetragen, eine lineare Regression wurde für den Bereich 0.01 - 0.2 mM K^+/l und 0.01 - 0.2 mM Na^+/l berechnet. Kontrollen zeigten, daß keine Interferenz Na^+/K^+ auch bei hundertfachem Überschuß von K^+ auftrat, ebenso war keine Korrektur der Eichkurven für Ionengehalte der Nährlösung nötig.

2.3.8. Bestimmung des Chlorid- und des Ammoniumgehalts

2.3.8.1. Chloridgehalt

Der AMINCO-COTLOVE-Chloride-Titrator (Clinical Model 4-4416) titriert die Cl^--Aktivität einer wässrigen Probe elektrochemisch (Kombination Coulo- und Amperometrie) in einem Reagenz von 0.1 N HNO_3 und 10 % Eisessig mittels 2 Meß- und 2 Generatorelektroden. Die Titrationszeit wird im high, medium und im low level-Meßbereich in Sekunden angezeigt.
Die Zellen wurden entsprechend der K^+- und Na^+-Bestimmung aufgeschlossen (2.3.6.3). Der Cl^--Gehalt der Proben war sehr niedrig, für eine genaue Messung waren aliquots von 1 - 1,5 ml des Aufschlusses nötig, dadurch erreichte das Meßreagenz einen pH von etwa 0.5. Die Proben wurden mit NaOH, aqua dest. und Titrationsreagenz auf einen pH-Wert von 1,5 titriert (Endvolumen 3 ml). Die Nullwerte wurden entsprechend korrigiert. Die Nettotitrationszeit wurde in mM umgerechnet, bzw. die intrazelluläre Cl^--Konzentration in mmol/l Zellwasser berechnet.

2.3.8.2. Photometrische Ammoniumbestimmung

Die Vorschriften der Firma MERCK AG, Darmstadt ("Untersuchungen von Wasser", 6. Aufl.) dienten als Vorlage für den quantitativen Nachweis mit Seignettesalz und NESSLER's-Reagenz, da keine anderen Ionen und Aminosäuren bei der gewählten Verdünnung interferierten, konnte auf Vorbehandlungen verzichtet werden. Proben und Eichlösungen (Verdünnungen von 0.1 N NH_4Cl-Lösung) sowie Nullwerte von NH_4-freiem Wasser wurden im EPPENDORF-Spektralphotometer bei 405 nm (Hg-Filter) in Kunststoffküvetten gemessen.

2.3.9. Korrektur der Ionengehalte des Mediums

Unter den üblichen Kulturbedingungen in Algenkulturröhren verdunstet je nach Größe der Röhre und Volumen der Suspension 5 - 8 % des Mediums in 36 - 48 h, ein zu hoher Ionengehalt wird vorgetäuscht. Folgende Rechenvorschrift korrigiert die Konzentrierung des Mediums:

$$c_{jo\ korr} = c_{jo\ mess} \times (1{,}0 - d'E) \qquad (3)$$

wobei

$c_{jo\ korr}$ = korrigierter Ionengehalt einer Ionenspezies j im Medium in mM,

$c_{jo\ mess}$ = gemessener Ionengehalt einer Ionenspezies j im Medium in mM,

d' = Tage Kulturdauer nach Neuinoculation,

E = Verdunstung in %/Tag bedeutet.

2.4. Aufnahme von Ionen, Substraten und Phytohormonen

2.4.1. Kriterien der Zellsuspensionen für Experimente

Für Versuche geeignet und verwendet wurden Kulturen in der logarithmischen oder frühen stationären Wachstumsphase, in der Regel 4 - 6 Tage nach Inoculation mit einem Anteil von mindestens 40 % "hyaliner" Zellen und 10 % Zellen in Teilung. Außerdem wurde noch Wert gelegt auf:

- homogene Größe der Zellen (etwa 35 µm Durchmesser),
- Hauptanteil von Zellaggregaten mit 4 - 6 Zellen,
- pH 4,5 - 5,2 und eine Leitfähigkeit 1 - 3 mS des Mediums,
- eine Zellzahl von 0.6 - 1,8 $x10^6$ Zellen/ml Suspension.

2.4.2. Nährmedium für Aufnahme- und Effluxversuche

Für alle Experimente wurde ein vereinfachtes Medium gewählt (siehe Tab. 1), dessen Osmolarität, Gesamtionenstärke, Pufferkapazität und Ionenaktivitäten für K^+, Na^+, Ca^{++}, Mg^{++}, Cl^-, SO_4^{--}, PO_4^{3-}, NH_4^+ und NO_3^- dem Kulturmedium entsprachen. Vitamine, Aminosäuren, Spurenelemente spielen eine ungeklärte Rolle bei Phytohormonwirkungen, sie wurden daher nicht ins Medium aufgenommen. Bei Sauerstoffverbrauchsmessungen konnte kein Unterschied zwischen diesem und dem Kulturmedium festgestellt werden (siehe 3.1.5.) Das sterilfiltrierte Experimentalmedium wurde im Kühlraum aufbewahrt.

IAA und 2,4-D wurden in 10^{-3} M Stammlösung im Experimentalmedium im Wasserbad bei 50 °C etwa 3o min erwärmt und im Kühlschrank lichtgeschützt gelagert oder zumeist vor den Experimenten angesetzt. Andere Phytohormone bzw. Hormoninhibitoren (NAA, NPA, TIBA) wurden zuerst in Äthanol abs. aufgelöst (5 % des Gesamtvolumens), dann unter Rühren und Erwärmen mit Experimentalmedium bis zur gewünschten Molarität verdünnt.

2.4.3. Standardbedingungen für die Äquilibration und Inkubation

2.4.3.1. Äquilibration

Proben der Suspension wurden unter sterilen Bedingungen entnommen, deren Volumen gemessen, in der Impfkammer auf Nylonnetz von 15 - 2o µm Maschenweite (Firma Deutsche S.A.T.I., Mössingen) abgenutscht. Während des Abfilterns wurde mit 5 - 8 ml Citrat-Phosphatpuffer etwa 3o s lang nachgewaschen. Unter halbsterilen Bedingungen wurde der feuchte Zellkuchen sofort in einen mit Experimentalmedium gefüllten sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben gespatelt und bei 25 - 27 °C im Dunkeln im Reziprokschüttler geschüttelt (KÖTTERMANN, Stufe 8, etwa 12o - 15o rpm). Bei längeren Äquilibrationen (10 - 24 h) wurde in Algenkulturröhren belüftet. Im allgemeinen wurde 60 - 120 min äquilibriert, dies reichte aus um einen quasi-steady state für Ionenflüsse und Stoffwechselprozesse aufgrund veränderter Kulturbedingungen zu erreichen.
Bei Aufnahmeversuchen wurden die Zellsuspensionen mit Lö-

sungen (Substrate, Phytohormone, etc.) und Radionukliden inkubiert, deren Konzentrationen wurden so gewählt, daß weder Verdünnungen, Veränderungen des pH noch Erhöhungen der Ionenaktivitäten eintraten. Bei allen Aufnahmeexperimenten lagen die Aktivitäten der Radionuklide im Bereich von 0.5 - 1.0 x 10^{-6} Ci/ml Medium.

2.4.3.2. Probennahme der inkubierten Suspensionen

Mit einer 5 ml Einmalspritze wurden aliquots von 2 - 3 ml der Suspension entnommen, bei zeitabhängigen Aufnahmen in Abständen von z.B. 5 - 10 - 20 - 30 - 60 - 90 etc. min nach dem Einpipettieren der Nuklide, Phytohormone bzw. Substrate. Bestimmungen des TW schwankten um 15 % (TW im Bereich von 6 - 15 mg/Probe).

Bei Experimenten vor November 1975 wurden Proben auf WHATMAN C Glasfaserfilter (25 mm Ø) unter Nachwaschen vom 80 ml eiskaltem Citrat-Phosphatpuffer binnen 30 - 45 s abgenutscht (Isotopenverdünnungsmethode). An den Zellen bzw. am Filter anhaftende Nuklide wurden mit diesem Waschvolumen entfernt bzw. konnten als background korrigiert werden.

Bei Experimenten nach November 1975 wurde statt Glasfaserfilter Nylonfilter (Maschenweite 15 - 20 µm) benützt, die Proben wurden in vorgekühlten Szintillationsgläschen bei - 15 °C bis zur Getriertrocknung aufbewahrt.

2.4.3.3. Aufschluß der Proben

Die Proben auf dem Glasfaserfilter (TW 4 - 10 mg) wurden mit

1 ml 10 %-iger Triton X-100-Lösung etwa 1h auf 40 - 50 °C erwärmt, dadurch wurden die Zellen lysiert und Luftbläschen aus dem Filter entfernt.

In Experimenten nach November 1975 wurde der lockere Zellkuchen (TW von 10 - 20 mg) vom Nylonnetz abgespatelt, im Szintillationsgläschen fein zerstoßen, in 1,5 - 2,0 ml aqua dest. suspendiert und 30 - 60 min bei 40 - 50 °C erwärmt. Die Suspension wurde 1 - 2 min bei Stufe 1 bis 2 (je nach TW und Konsistenz der Suspension) im BRANSON-Ultraschallhomogenisator so lange beschallt, bis eine feine und flockige Suspension erhalten wurde (BRANSON-Sonifier, Firma BRANSON Instr., Stamford, USA, mit micro-tip). Am micro-tip anhaftende Zellen wurden mit 0.5 ml aqua dest. abgespült, Proben mit hohem TW wurden auf ihren Homogenisationsgrad hin nochmals überprüft.

2.4.4. Flüssigszintillationsmeßtechnik bei Aufnahmeexperimenten

2.4.4.1. Geräte und Szintillationsmischungen

Diese Geräte wurden benützt:

PACKARD TRICARB Modelle 3320 und 3003

PACKARD Gamma-Counter Modell 2650

LSC BF 2000 A und 5003 A mit DIEHL-Combitron S und Lochstreifenleser bzw. mit TELETYPE der Firma BF-Vertriebs-GmbH, Wildbad.

Die verwendeten Szintillationsmischungen sind unter 2.1.2. aufgeführt, überwiegend wurden die Szintillationsflüssigkeiten "TX-100", "TX-114" und UNISOLVE benützt.

2.4.4.2. Messung der Proben

Der wässrige Zellaufschluß wurde im Volumenverhältnis 1:3 mit Szintillationsflüssigkeit ("TX-100" bzw. "TX-114" bzw. UNISOLVE) vermischt, bei hohem TW (15 - 22 mg) wurde das Verhältnis auf 1:4 erhöht. Bei allen Experimenten wurden Messungen in der Mischungslücke (15 - 23 % Wasseranteil) vermieden um Phasenentmischungen (instabile Emulsion) und dadurch rapide Verschlechterungen der Zählausbeute zu verhindern. Die "TX"-Szintillationsmischungen bilden bei etwa 5 - 7 °C ein festes Gel, in dem Zellen suspendiert sind, hingegen bilden UNISOLVE-Emulsionen schon bei Zimmertemperatur feste Gele, die bei 10 - 12 °C opak bis klar werden. Nach dem Abkühlen wurden Zählausbeuten von 40 - 50 % für ^{3}H und über 60 % für ^{14}C berechnet, Messungen nach einigen Tagen ergaben keine geringeren Zählausbeuten. Quenchkorrekturen erwiesen sich für diese Methode als zuverlässig und reproduzierbar.

2.4.4.3. Eigenschaften der Szintillationsmischungen

Szintillationsmischungen auf Dioxan- oder Toluol-Äthanolbasis nehmen bis zu 10 % (Vol/Vol) wässrige Lösungen auf, die Zählausbeute ist dann noch zufriedenstellend. ANDERSON und McCLURE (1973) empfahlen eine Mischung von Xylol/Triton X-114 im Verhältnis 3:1 (Vol/Vol), die bis zu 30 % wässrige Proben aufnehmen kann und als Emulsion gute Zählausbeuten aufweist. Die Szintillationsmischungen wurden für wässrige, zuckerhaltige Proben bzw. Proben mit suspendierten Zellen abgeändert. Die

Mischungen "TX-100" und "TX-114" bieten diese Vorteile:

- Szintillationsflüssigkeiten auf Xylolbasis sind ungiftig,
- 30 - 35 % (Vol/Vol) 0.1 M Salz- und Zuckerlösungen werden aufgenommen, Zählausbeute für ^{3}H schwankt je nach Wassergehalt der Emulsion zwischen 20 - 45 %,
- die Emulsion ist bei 7 - 12 °C sehr stabil,
- Quenchkorrekturen lassen sich besonders für die ESKV- und KV-Methode gut durchführen, unter üblichen experimentellen Bedingungen werden lineare Quenchkurven erhalten.

2.4.4.4. Quenchkorrekturmethoden

Heterogene Proben mit einer festen und flüssigen Phase (z.B. Proben auf WHATMAN C Glasfaserfilter) zeigen ein nicht-lineares Quenchverhalten bei Quenchreihen mit steigendem TW auf dem Filter. Die KV-Methode ist erlaubt und dabei werden zuverlässige Werte bis zu einem TW von 2o mg erzielt. Die Zählausbeute muß für jede Probenserie, jede Szintillationsmischung, jedes Nuklid und jedes Gerät neu bestimmt werden.

Für Proben mit suspendierten Zellen in einer Szintillationsemulsion eignet sich die KV- und ESKV-Korrekturmethode, insbesondere für die Nuklide ^{14}C, ^{36}Cl. Die Kanaleinstellungen des Geräts BF 2000 bzw. 5003 wurden so gewählt, daß lineare Quenchkurven erhalten wurden und zugleich eine hohe Zählausbeute und eine gute Trennung der Nuklide bei Mehrfachmarkierungen gewährleistet war. Alle Proben wurden 4 - 10 min lang gemessen (d.h. für alle Aufnahmeexperimente) und Mittelwerte berechnet.

2.4.4.5. Meßtechnische und rechnerische Trennung bei Mehrfachmarkierungen

Die meßtechnische und rechnerische Trennung der Nuklide bei der Doppeltmarkierung $^{36}Cl/^{22}Na$ konnte aufgrund der physikalischen Daten: ^{22}Na ein β^+-Strahler von 0.55 MeV und ^{36}Cl ein β^--Strahler von E_{max} = 0.7 MeV gelöst werden.
Bei einer Dreifachmarkierung von $^{36}Cl/^{22}Na/^{14}C$ war die Trennung aufgrund einer Kombination von Screening- und Channels-ratio-Methode möglich. Die channel ratio wird z.B. für eine Kanaleinstellung von 0 - 400, 400 - 600, 600 - 1000 berechnet (für BF 2000 bzw. 5003) und anhand von Quenchkorrekturkurven die Nuklide rechnerisch getrennt. Eine meßtechnische Trennung der Nuklide war wegen überlappender Beta-Spektren bei höherem Quench nicht möglich.
Tritium wird bei Mehrfachmarkierungen mit der Screeningmethode meßtechnisch getrennt. Bei hohem Quench ist die Zählausbeute unter 20 % und Unregelmäßigkeiten bei der Probenaufbereitung können zu relativ großen Schwankungen der Zählausbeute führen.
Die rechnerische Auswertung erfolgte mit einem programmierbaren Taschenrechner (HEWLETT-PACKARD HP 25).

2.5. Effluxmessungen

2.5.1. Entnahme von Zellen unter halbsterilen Bedingungen

Folgende methodische Alternativen erwiesen sich bei Effluxversuchen als vorteilhaft:

Die Zellsuspension wird bei 150 g, Zimmertemperatur, 5 min abzentrifugiert (SORVALL RC2), der Überstand kontrolliert und dessen pH und Leitfähigkeit gemessen. Das lockere Sediment wird im Experimentalmedium gewaschen, nochmals abzentrifugiert und im Medium resuspendiert.

Der Überstand der Suspension wird nach 5 - 10 min Sedimentation abpipettiert und kontrolliert. Die Zellen werden mit Experimentalmedium gewaschen, nach dem erneuten Absetzen der Überstand abgehoben und die Zellen resuspendiert (Experimente vor März '76).

Für Experimente ab März 1976 gelten die unter 2.4.3.1. angegebenen Bedingungen.

2.5.2. Äquilibrations- und Inkubationsbedingungen

Für Äquilibrations- und Inkubationszeiten von 1 - 10 h gelten ebenfalls die unter 2.4.3.1. vorgeschlagenen Bedingungen, bei 12 - 24 h dauernden Inkubationen wurden die Suspensionen in Kulturröhren in der Kulturkammer belüftet.

Die Suspensionen wurden am Ende der Äquilibrations- und Inkubationszeit mikroskopisch kontrolliert; weder eine mikrobielle Kontamination noch ein auffallender Rückgang des Anteils von "hyalinen" Zellen war zu beobachten.
Phytohormone wurden kurz vor den Versuchen angesetzt und den Medien in entsprechender Molarität zugegeben (Endmolarität 10^{-5} - 10^{-9} M). Zu Beginn der Äquilibration wurde zugleich mit Radionukliden inkubiert, und zwar in diesen Aktivitäten:

^{22}Na als Na^+-tracer (0,8 - 1,2 x 10^{-6} Ci/ml Suspension),
^{36}Cl als Cl^--tracer (0,6 - 0,9 x 10^{-6} Ci/ml Suspension),
^{86}Rb als K^+ -tracer (0,7 - 1,2 x 10^{-6} Ci/ml Suspension),
^{3}H-IAA als IAA-tracer (etwa 10^{-6} Ci/ml Suspension).

Die Molarität des Inkubationsmediums wurde durch ^{22}Na und ^{86}Rb nicht geändert, bei ^{36}Cl mußte die Molarität korrigiert werden. Das pH des Mediums blieb dank der guten Pufferkapazität auch bei hohen Markierungen unverändert.

2.5.3. Methodik der Effluxversuche

Für Effluxversuche wurde eine halbautomatische Vorrichtung für radioaktives Auswaschmedium mit Zeit- und Volumenkonstanz entwickelt, zugleich wurde die Sauerstoffversorgung der Suspension gewährleistet und das Auswaschmedium in Probenröhrchen gesammelt.

Beschreibung der Vorrichtung:

- ein Aquarienbelüfter versorgt über Vorfilter die Medien mit Normalluft, die Medien sind dadurch sauerstoffgesättigt,
- die Auswaschmedien wurden im Wasserbad auf 25 °C temperiert,
- über eine Peristaltikpumpe (LKB ReCyChrom 4912A) wird das Medium in einen Filtrationsvorsatz (SM 16517 bzw. 16514) gepumpt (Stufe 3 - 4 d.h. 2 - 2,5 ml/min),
- im Filtrationsvorsatz ist ein Nylonnetz (15 - 20 µm Maschenweite) eingespannt um einen guten Durchfluß zu gewährleisten,
- das radioaktive Medium wird in einem Fraktionssammler von Polystyrolröhrchen aufgefangen (LKB ULTRORAC , Type 7000).

Mit einer 5 ml Einmalspritze wurden aliquots der inkubierten Suspension entnommen und vorsichtig unter Nachwaschen von 2 bis 3 ml Medium im Filtrationsvorsatz aufgefangen um Kontaminationen durch die hohe Anfangsaktivität des DONNAN free space beim Auswaschvorgang zu verhindern. Der Filtrationsvorsatz wurde in die Vorrichtung eingespannt und sofort das Auswaschmedium aufgefangen, von der Entnahme der Zellen bis zum 1. Tropfen des Auswaschmediums dauerte es 45 - 75 s. In Effluxkinetiken konnte die Phase des AFS noch nachgewiesen werden, die schnelle Austauschkinetik des Cytoplasmas wurde durch diese Prozedur nicht betroffen (vgl. Abb. 28, 29).

2.5.4. Probenaufbereitung für Messungen der Radioaktivität

2.5.4.1. Wässrige Proben

Die Aktivität von ^{22}Na wurde im PACKARD -Gamma-Counter gemessen. Die β^+- bzw.β^--Aktivität von ^{36}Cl, ^{22}Na und ^{86}Rb mußte in den Flüssigszintillationsmeßgeräten gemessen werden. Das Medium wurde quantitativ für diese Messungen in Szintillationsgläschen umgefüllt und mit Szintillator ("TX-100", "TX-114") im Verhältnis 1:3 bis 1:4 (Vol/Vol) vermischt. Die schlierenfreie, opake bis klare Emulsion war bei $\pm$ 10 ^{o}C ein festes Gel, sie wurde einige Zeit kühl gelagert und 10 min gemessen. Zählausbeute für ^{22}Na war 75 %, für ^{36}Cl 80 - 83 % und für ^{86}Rb 90 %.

2.5.4.2. Zellproben

Nach der Trockengewichtsbestimmung wurden die Zellkuchen ohne Nylonnetz zuerst im PACKARD-Gamma-Counter gemessen und die Selbstabsorption korrigiert, danach wurden die Proben nach 2.4.3.3. aufgeschlossen und die ß-Aktivität gemessen.

2.5.5. Meßtechnik für Effluxproben

2.5.5.1. Quenchkorrekturmethoden

Optimale Zählausbeuten für Nuklide hängen von den Geräte- und den Szintillatoreigenschaften ab, es wird daher auf die genaue Angabe von Einstellungen verzichtet.
Quenchkurven mit verschiedenen Korrekturmethoden (Interner Standard, KV, ESKV) mit steigendem Mischungsverhältnis Medium/Szintillator (d.h. mit verschiedenen Szintillationsmischungen) wurden aufgestellt. Da bei konstanter Temperatur gemessen wurde, konnte der Einfluß der Temperatur auf die Haltbarkeit der Emulsionen bzw. auf das Quenchverhalten vernachlässigt werden. Die obengenannten Korrekturmethoden erwiesen sich als zuverlässig und methodisch zulässig bei Meßzeiten von 10 min. Quenchkorrekturen für Zellproben wurden nach 2.4.4.4. ermittelt.

2.5.5.2. Messungen von Mehrfachmarkierungen

Bei Doppeltmarkierungen mit $^{36}Cl/^{86}Rb$ wurden die Nuklide nach dem von PFRÜNER (1972) genannten Verfahren getrennt, vorausgesetzt, daß zwischen den Meßintervallen keine Veränderung

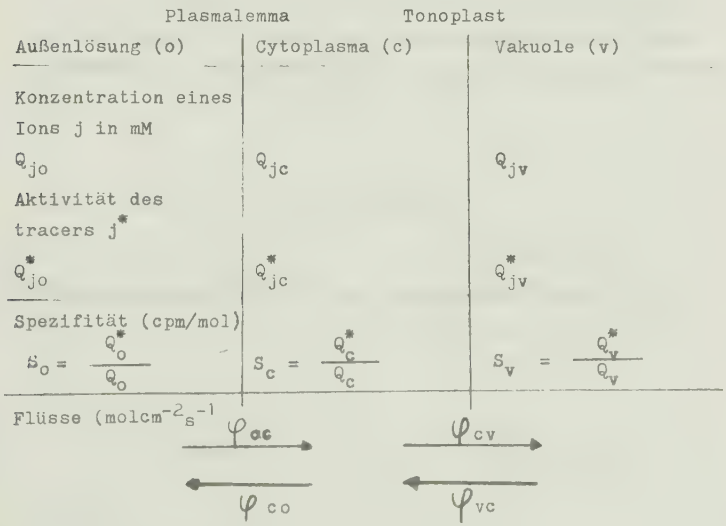
der Zählausbeuten und keine Spektrumsverschiebung insbesondere für ^{36}Cl infolge der Entmischung der Emulsion eintritt. Bei Markierungen mit $^{22}Na/^{36}Cl$ wird die β^+-Aktivität von ^{22}Na zuerst gemessen (Einstellung des PACKARD-Gamma-Counters full 1, fine o9o, window 420 - 600), dann beide Nuklide im Flüssigszintillationszähler gemessen und rechnerisch getrennt. Für Dreifachmarkierungen $^{22}Na/^{36}Cl/^{86}Rb$ wurde ein Gerät mit logarithmischem Weitbereichsverstärker gewählt (BF 5003). Meßtechnisch und rechnerisch wurden die Nuklide anhand der genannten Kombinationen bei Doppeltmarkierungen getrennt. Der Anteil von ^{86}Rb am ^{22}Na-Spektrum (im Gamma-Counter) wurde berücksichtigt. Die Güte dieses Trennverfahrens wurde durch Effluxanalysen bewiesen, bei denen Kinetiken (Reaktion 1. Ordnung in serialer Folge) der 3 Zellkompartimente mit einem Regressionskoeffizienten von 0,978 - 0,999 berechnet werden konnten (vgl. Abb. 21 — 23).

Trennungen der Nuklide mit Hilfe von "Čerenkov-Counting" hängen vom Brechungsindex des Mediums und vom Zählvolumen ab, diese Faktoren müssen konstant gehalten werden. Die Zählausbeute von ^{86}Rb mit 33 - 40 % ist stabil, hingegen schwankt die Zählausbeute von ^{22}Na und ^{36}Cl (4 - 7 %) stark, geringe Aktivitäten können daher nicht mehr zuverlässig gemessen werden.

2.6. Auswertung der Effluxdaten

2.6.1. Kompartmentanalyse

PITMAN (1963), CRAM (1968), HOPE (1971), WALKER und PITMAN (1976) untersuchten Isotopenaustauschkinetiken zwischen radioaktiv markiertem Gewebe (bzw. Zellen) und nichtmarkierter Außenlösung unter quasi-steady state Bedingungen der Ioneninfluxe und -effluxe. Sie entwickelten ein mathematisches Modell von unabhängigen, unidirektionalen Einzelflüssen an den Kompartimentsgrenzen von Zellen. Mit dieser Methode der Kompartmentanalyse können aus den Daten von Effluxexperimenten die Reaktionskonstanten der Ionenflüsse von den Kompartimenten und die Einzelflüsse von und zu den Kompartimenten sowie deren Ionenkonzentrationen berechnet werden. Untenstehend wird das Schema (und die übliche Symbolik) eines serialen Drei-Kompartment-Modells der pflanzlichen Zelle wiedergegeben, wie es sich in zahlreichen Untersuchungen bestätigt hat.



Die Änderung von Q_T^*, Q_c^* und Q_v^* ($\frac{dQ_T^*}{dt}$, $\frac{dQ_c^*}{dt}$, $\frac{dQ_v^*}{dt}$) während des Auswaschvorgangs kann gemessen werden, denn die Flüsse an den Kompartimentsgrenzen verringern die spezifischen Aktivitäten in den Kompartimenten. Folgende Grundgleichungen beschreiben diese Veränderungen unter quasi-steady state der Ionenflüsse:

$$\frac{dQ_c^*}{dt} = \varphi_{oc}S_o + \varphi_{vc}S_v - (\varphi_{co} + \varphi_{cv})S_c \qquad (4)$$

$$\frac{dQ_v^*}{dt} = \varphi_{cv}S_v - \varphi_{vc}S_v \qquad (5)$$

$$\frac{dQ_T^*}{dt} = \varphi_{oc}S_o - \varphi_{co}S_c \qquad (6)$$

Durch Ableitungen und Umformungen lassen sich unidirektionale, unabhängige Flüsse und Ionenkonzentrationen der Kompartimente aus diesen Differentialgleichungen berechnen, Einzelheiten sind bei PITMAN (1963), CRAM (1968), HOPE (1971), WALKER und PITMAN (1976) angegeben. Es gelten diese Gleichungen:

$$\varphi_{oc} = k_c I_c + \frac{I_v}{t_{in}} \qquad (7)$$

$$\varphi_{co} = k_c I_c + k_v Q_v \qquad (8)$$

$$\varphi_{cv} = \varphi_{oc} + \varphi_{vc} - \varphi_{co} \qquad (9)$$

$$\varphi_{vc} = \varphi_{oc} \frac{k_v Q_v}{k_c I_c} \qquad (10)$$

$$Q_c = \frac{\varphi_{co} + \varphi_{cv}}{k_c} \qquad (11)$$

2.6.2. Berechnung von Q_v

Q_v kann über die Kompartmentanalyse nicht direkt bestimmt werden, es muß aus den Daten der intrazellulären Ionenbestimmungen errechnet werden. Es wird angenommen, daß Q_v den Vakuolengehalt repräsentiert, während des Auswaschvorgangs konstant bleibt und das Vakuolenvolumen sehr viel größer als das Cytoplasmavolumen ist. Aus folgenden Einzeldaten wurde Q_v (mol/cm^2 austauschbare Vakuolenoberfläche) bestimmt:
1 mg TW = 0,7 - 1,0 x 10^6 Zellen, Zelldurchmesser 37 $\pm$ 8 µm, Zellaggregate zu 4 - 8 Zellen mit höchstens 16 % gemeinsamer Oberfläche, Vakuolenvolumen 87 - 90 % und Cytoplasmavolumen 3 - 7 % des Gesamtvolumens in der logarithmischen Wachstumsphase (entspricht einem 0,5 - 0,7 µm dickem Cytoplasmabelag).

Q_v für K^+ : 1,5 - 4 x 10^{-8} mol/cm^2
Q_v für Na^+ : 2,5 - 5 x 10^{-9} mol/cm^2
Q_v für Cl^- : 4 - 8 x 10^{-11} mol/cm^2.

Es müßte noch beachtet werden, daß der gemessene Gehalt der Ionen wahrscheinlich nicht mit der Aktivität der Ionen übereinstimmt, die am Transport bzw. an Flüssen beteiligt sind und bei hohen Q_v- und Q_c-Werten anstelle von Molaritäten Aktivitäten berechnet werden müßten.

2.6.3. Graphisch-numerische Auswertung

Die Gesamtaktivität Q^*_{Ti} der Zellen in cpm bzw. dpm wird zur entsprechenden Auswaschzeit t_i aufgetragen, die Aktivität der Zellen wird am Ende des Auswaschens nochmals gemessen.

Der Auswaschvorgang muß so lange dauern, bis eine langsame Kinetik (HWT mehrere Stunden) deutlich graphisch-numerisch zu berechnen ist. Die Kinetik dieser Phase (-k, HWT, apparenter Inhalt des Nuklids I bei t = o) wird berechnet. Dieser Kinetik gehen im Normalfall zwei schnellere Kinetiken voraus, sie werden der Cytoplasmaphase und der Gesamtkinetik des AFS und interzellulären Raums zugeschrieben. Durch Subtrahieren der langsamsten Kinetik (Vakuolenkinetik) von der Gesamtkinetik können die schnelleren Kinetiken berechnet werden. Zumeist werden 3 Kinetiken (Reaktionen 1. Ordnung) mit Reaktionskonstanten k_o, k_c, k_v, (und zugehörigen Halbwertszeiten) und die apparenten Inhalte I_o, I_c und I_v zur Zeit t = 0 bestimmt.

Die Gesamtaktivität und die Restaktivitäten der Kompartimente werden nach PITMAN (1963), CRAM (1968) und WALKER und PITMAN (1976) graphisch aufgetragen. Die numerische Auswertung der Kinetiken erfolgte durch ein fitting-Programm für die Funktion $y = I_{t=o}\ e^{-kt}$. Durch Subtrahieren der Funktion $y = I_o.e^{-kt_i}$ von der Summenfunktion der Gesamt- bzw. Restaktivitäten zur Zeit t_i konnten die Werte für die restlichen schnelleren Kinetiken berechnet und graphisch aufgetragen werden. Die Werte I_o, I_c, I_v, k_o, k_c, k_v wurden durch die Berechnung des Regressionskoeffizienten r (best fit-Methode) und durch graphische Kontrolle optimiert.

2.6.4. Regressionsanalysen

Lineare Regressionen wurden für die Eichkurven der Na^+- und K^+-Bestimmung und für die Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate berechnet und durch die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes r optimiert.

Die Eichkurve für die NH_4^+-Bestimmung ließ sich durch eine Funktion $y = a + b \ln x$ annähern. Quenchkorrekturkurven ließen sich nur über Polynome 3. bis 4. Grades annähern, daher wurden Proben nur im linearen Bereich gemessen.

Die Reaktionskonstanten von Effluxkinetiken lassen sich durch eine exponentielle Regression berechnen, das Bestimmtheitsmaß r war das Kriterium für den best fit der Exponentialfunktion.

In der Regel wurden Experimente 2 - bis dreimal wiederholt und Experimentserien so geplant und durchgeführt, daß Kontrollexperimente frühere Versuche bestätigten (interne Kontrolle). Von Experimenten, die mehr als 2- bis 3mal reproduziert wurden, wurde die Standardabweichung des Mittelwerts berechnet und in den Abb. und Tabellen dargestellt (vgl. Abb. 31 - 33, oder Tab. 2, 3, etc.). Bei Modellrechnungen oder Rechnungen mit Daten mit größeren Standardabweichungen (vgl. Tab. 2, 6, 8, 12 - 15) wurde es als sinnvoll erachtet, nicht die Mittelwerte, sondern die höchsten und niedrigsten Werte als Berechnungsgrundlage zu nehmen. Die in den Abb. 3, 4, 5, 7, 13 - 16, 19, 20 etc. gezeigten Einzelexperimente wurden als typische und repräsentative Ergebnisse von Experimentalserien angesehen (vgl. Abb. 21 - 23, 28 - 30).

3.0. Ergebnisse

3.1. Quantitative Daten über den Kulturverlauf

3.1.1. Beschreibung der Suspensionskulturen

Die Zellpopulation besteht aus morphologisch homogenen, rundlich-ovalen, undifferenzierten Zellen, zumeist in Zellaggregaten zu 4 - 8 Zellen (Abb.1,2), als durchschnittlicher Durchmesser der Zellen wurde in allen Kulturmedien - auch in IAA- bzw. Hormonmangelmedium etwa 34 - 38 µm gemessen. In einer Suspensionskultur können verschieden differenzierte Klone mit unterschiedlichem physiologischem Potential und verschiedenen Generationszeiten nebeneinander kultiviert werden. Bei der angewandten diskontinuierlichen Kulturmethode initiiert eine Neuinoculation einen teilweise synchronen Wachstumsverlauf mit lag-, logarithmischer und stationärer Phase (Abb. 3). Analog zum mikrobiellen Wachstum können Parameter des Bakterienwachstums für Suspensionskulturen berechnet werden (Teilungsrate, Generationszeit, etc.). In Untersuchungen über Suspensionen verschiedener Spezies wurden diese Beobachtungen bestätigt (PFRÜNER, 1972, GUTKNECHT, 1976, JONES et al., 1973, GOULD, 1974, HAHLBROCK, 1972 und 1975, BERGMANN et al., 1976). Werden Suspensionen über mehrere Jahre subkultiviert, können Klone mit verschiedenen Ploidiestufen (2 - 8 n) mit unterschiedlichen Generationszeiten entstehen (SMITH und STREET, 1974, GOULD et al., 1974 , BUTCHER et al., 1975).

Können Zellsuspensionen über den Zeitraum dieser Untersuchungen (1971 - 1976) als konstant betrachtet werden oder führt längere Subkultivierung zur Selektion von Klonen mit veränderten Eigenschaften (Hormonautotrophie, Generationszeiten, etc.) oder zur Habituierung an äußere Bedingungen (Phytohormone, Substrate, Ionengehalte der Medien)? Können daher Daten über Wachstumsparameter, Phytohormonwirkungen, Transportleistungen über längere Zeit verglichen werden?

Untersuchungen über das Wachstum und die Generationszeiten der Suspensionen zeigten, daß die Generationszeiten sich nicht veränderten (PFRÜNER, 1972, GUTKNECHT, 1976), ebenso blieb die Dauer der Wachstumsphasen (Abb. 3) konstant. Messungen des durchschnittlichen Zelldurchmessers 33 - 40 µm in der logarithmischen Wachstumsphase, die Relation TW:FW = 7 - 8 %, die Größe der Zellaggregate konnten bestätigt werden. Die Transport- bzw. Aufnahmerate von Cl^-(^{36}Cl) bzw. K^+(^{86}Rb) (BENTRUP et al., 1973) früherer Messungen: 5 nmol/10^6 Zellen x h bzw. 0.2 µmol/10^6 Zellenxh für K^+ unter IAA-Mangelbedingungen können mit den in Tab. 3 angegebenen Daten verglichen werden. Ein Kriterium ist die Abhängigkeit des Wachstums von Phytohormonen, Untersuchungen über einen längeren Zeitraum zeigten aber (PFRÜNER, 1972, GUTKNECHT, 1976), daß die Proliferationsrate, die Zunahme des Trockengewichts/ml, der Anteil "hyaliner" Zellen in Medien ohne IAA bzw. ohne Phytohormone und Kinetin deutlich abnahm. Damit kann eine Habituierung der Zellen bzw. eine Hormonautotrophie (genetische Veränderung) ausgeschlossen werden.

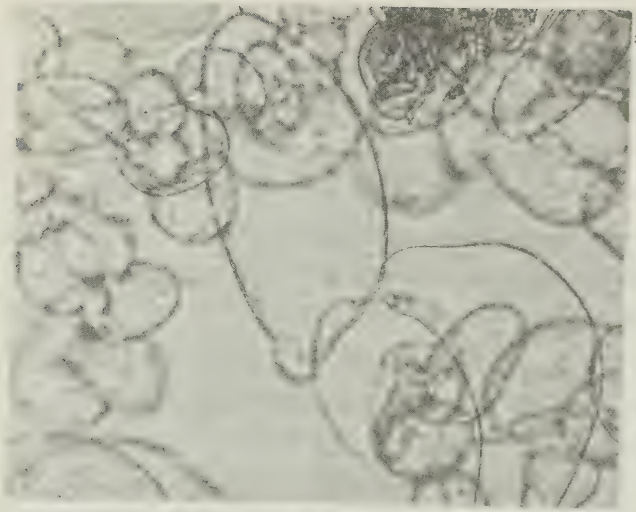


Abb. 1

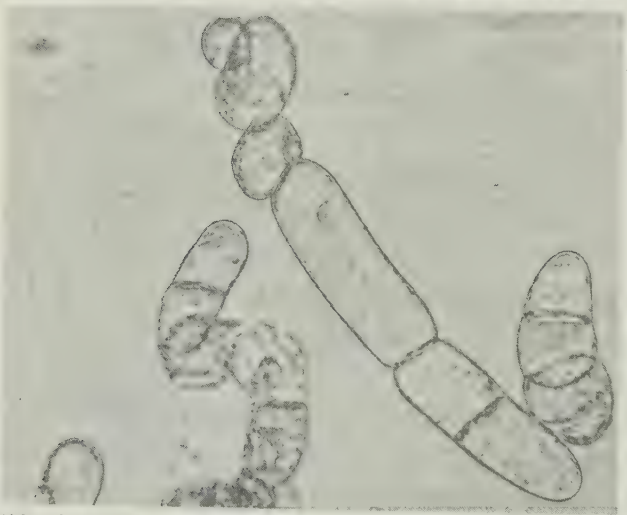


Abb. 2

Abb. 1: Zellaggregate (Mikrophoto) von PETROSELINUM-Suspensionszellen in der logarithmischen Wachstumsphase (Zelldurchmesser der "hyalinen Zellen" 30 - 40 µm)

Abb. 2: längliche Zellen, typisch für die stationäre Wachstumsphase (1 - 2 % Anteil). Beide Photos wurden von W. GUTKNECHT zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Wachstumsverlauf einer Kultur

Die Zunahme des TW/ml wird als Maß für Wachstum und als Kriterium für Wirkungen verschiedener Außenfaktoren (Substrate, Phytohormone, Temperatur) gewählt. Nach einer Neuinoculation läßt sich in einer Suspension (diskontinuierliche Kulturmethode) im Normalfall eine lag-Phase (1 - 2 Tage), eine logarithmische Phase (4 - 7 Tage) und eine stationäre Phase des Wachstums beobachten. Abhängig vom Kulturalter sind die Relationen: FW/ml bzw. TW/ml oder FW/10^6 Zellen bzw. TW/10^6 Zellen und TW/FW. Das Verhältnis TW/FW beträgt anfangs der logarithmischen Phase 6,3 $\pm$ 0,5 %, in der Mitte der logarithmischen Phase 7,3 $\pm$ 0,6 % und in der stationären Phase 8 - 12 %. (Abb. 3)

3.1.3. pH des Mediums

In Abb. 4 wird gezeigt, wie sich der pH-Wert des Mediums während des Wachstums verändert. Die Zunahme des pH zu Beginn der Proliferation (Ende der lag-Phase) könnte auf erhöhte Substrat- und Ionenaufnahme und dadurch auf einen erhöhten Stoffwechselumsatz (erhöhte CO_2-Abgabe ins Medium) zurückzuführen sein. Die Änderung des pH während des Wachstums ist mehr oder weniger deutlich bei Kallus- und Suspensionskulturen zu beobachten und hängt von der Spezies, von der Kulturmethode und vom Nährmedium ab (HAHLBROCK, 1972, 1 975, SYONO und FURUYA, 1968, GAMBORG und MILLER, 1968). Das pH des Mediums ist ein Indiz für den metabolischen Zustand einer Suspension und kann zusammen mit anderen Parametern den Wachstumsverlauf charakterisieren.

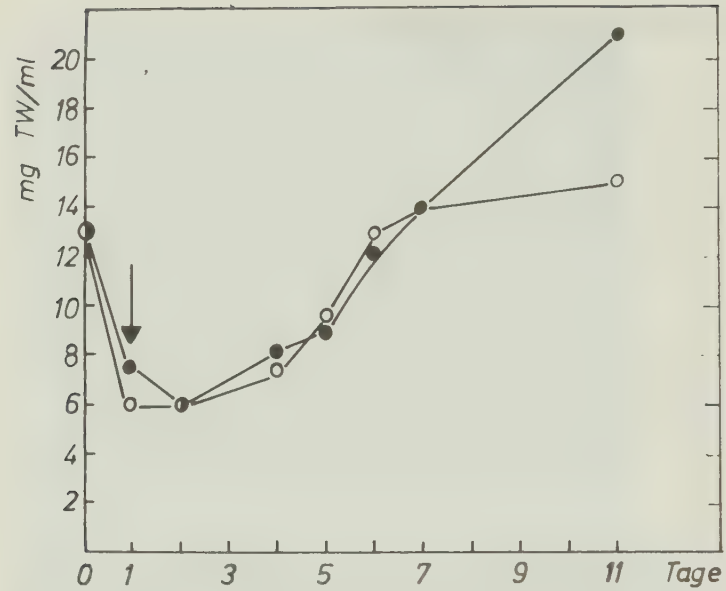


Abb. 3: Veränderung des Trockengewichts (mg/ml) während einer Kulturperiode (diskontinuierliche Kultur) bei PETROSELINUM-Zellsuspensionen. Pfeil = Tag der Neuinoculation, o - o und ● - ● bedeuten verschiedene Kulturen

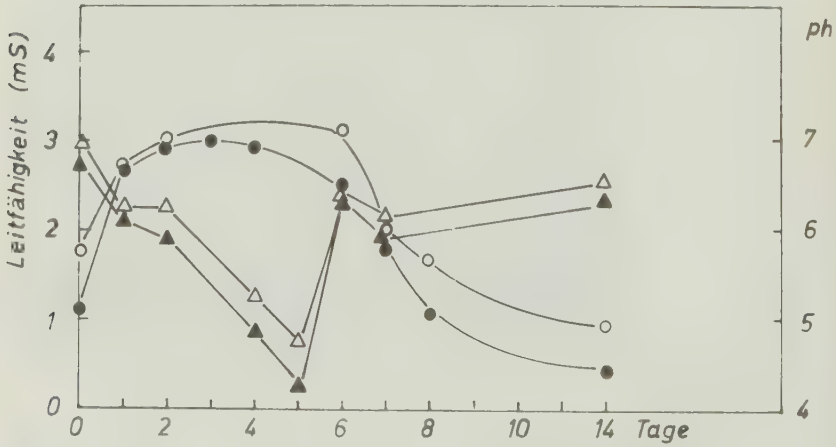


Abb. 4: Veränderung des pH (△) und der Leitfähigkeit (○) während einer Kulturperiode von PETROSELINUM-Zellsuspens., (Neuinoculation am Tag 1), △/▲ und ○/● sind verschiedene Kulturen

3.1.4. Leitfähigkeitswerte des Mediums

Die Gesamtionenaktivität des Mediums kann Hinweise auf die Stoffwechselaktivität, Enzymmuster und Enzymkonzentrationen sowie auf die Wachstumsphasen von Suspensionskulturen geben (HAHLBROCK, 1972 und 1975). Aus Abb. 4 wird deutlich, daß die Abnahme der Leitfähigkeit des Mediums während des Wachstums mit einer Änderung des pH (Abb. 4), mit einer Aufnahme von K^+ (Abb. 12), NH_4^+ und NO_3^- durch die Zellen sowie der Entfernung von K^+ (Abb. 8) und NH_4^- (Abb. 9) aus dem Medium korreliert. In Übereinstimmung mit den Daten von HAHLBROCK (1972 und 1975) können Leitfähigkeitswerte die Wachstumsphasen von PETROSELINUM-Zellsuspensionen charakterisieren.

3.1.5. Messungen der Sauerstoffverbrauchsrate

Die Wirkung von Medien, Substraten, Puffern und Phytohormonen kann unmittelbar über die Änderung der Sauerstoffverbrauchsrate von Suspensionen gemessen werden. Für den Nachweis schneller Phytohormoneffekte (Aufnahme- und Effluxversuche) wurde ein vereinfachtes Medium mit Glucose als Substrat gewählt, Glucose kann Saccharose als Substrat voll ersetzen (Abb. 5,6). Bei beiden Substraten wurde die gleiche Sauerstoffverbrauchsrate gemessen, während Mannitol als nicht metabolisierbares Substrat die Verbrauchsrate deutlich verringert. Phytohormone (entweder im Medium oder separat zugegeben), insbesondere IAA und 2,4-D (10^{-5} M), steigern die Verbrauchsrate binnen min um 25 - 30 %.

Äquilibrationsbedingungen und -zeiten (vgl. 2.4.3.1. und 2.5.2.) beeinflussen die Sauerstoffverbrauchsrate nicht wesentlich, Vorbehandlungen bzw. Äquilibration mit Mannitol bzw. Phytohormonen erhöhen deren Effekte deutlich. Mehrmalige Anaerobiose von 10 - 15 min im Kultur- und Experimentalmedium führt zu keiner sofortigen merklichen Schädigung der Zellen, vorausgesetzt sie werden zwischendurch 30 - 60 min in sauerstoffgesättigtem Medium gehalten.

3.1.6. Bestimmung der Zellzahl/ml und Anteil "hyaliner" Zellen an der Gesamtpopulation

Die Zellzahl/ml Suspension schwankt zwischen 0.5 - 3.0 x 10^6 Zellen, als Maß für Aufnahme- und Effluxexperimente wurde 0.33 - 1,2 x 10^6 Zellen/mg TW genommen, diese Schwankungen können teilweise durch die Variabilität der Zellgröße und die Änderung der Relation TW:FW während des Kulturverlaufs erklärt werden. Eine Standardisierung von Zellproben für Experimente (d.h. definierte Kriterien) ist daher notwendig.

Der Anteil "hyaliner" Zellen (% Gesamtpopulation) zusammen mit proliferierenden ("embryonalen") Zellen ist ein Kriterium für die Wachstumsphasen.(Abb. 7). Dieser cytologische Parameter ist zusammen mit anderen mikroskopischen und makroskopischen Beobachtungen (Färbung, Sedimentationsverhalten, Geruch) streng gültig. Der Anteil "hyaliner" Zellen an der Population stimmt vor allem in der logarithmischen Phase des Wachstums mit der Mitoserate überein (GOULD et al., 1974).

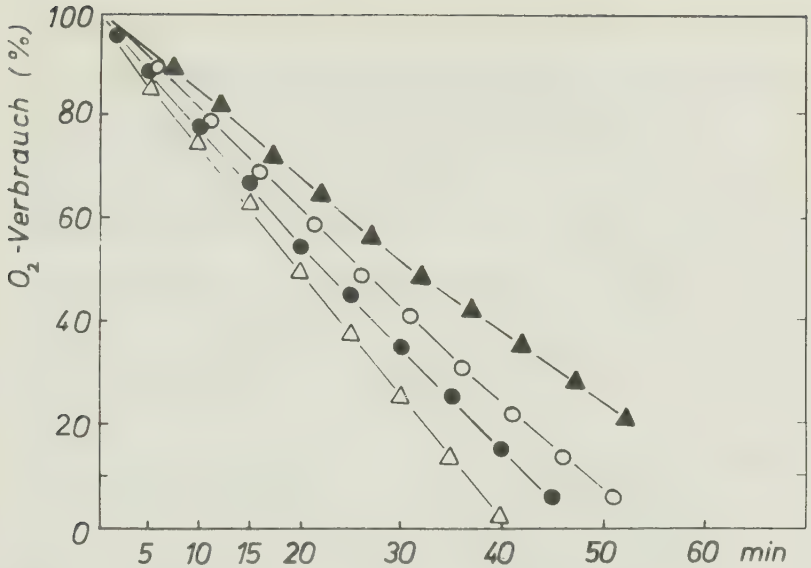


Abb. 5: Sauerstoffverbrauch (in % des Anfanggehalts) von PETRO-SELINUM-Suspensionen (Legende umseitig).

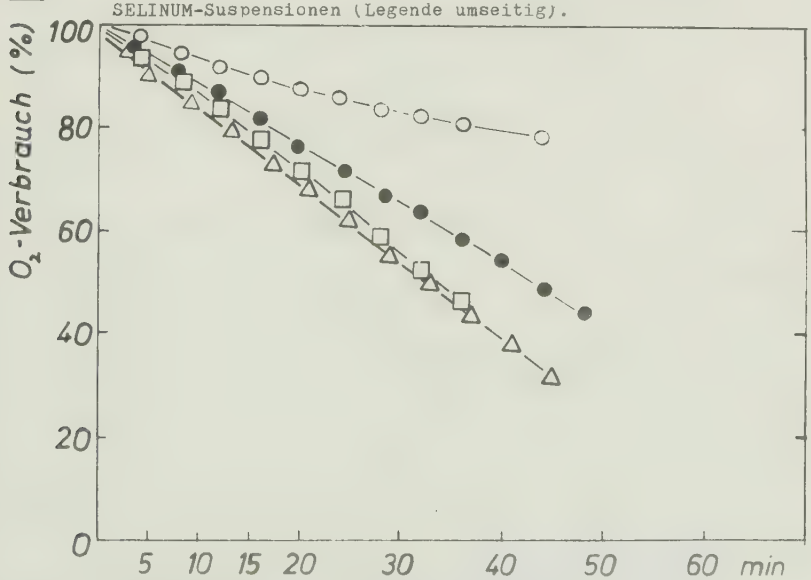


Abb. 6: Sauerstoffverbrauch (in % des Anfanggehalts) von PETRO-SELINUM-Suspensionen (Legende umseitig).

Legenden zu den Abb. 5 und 6:

Abb. 5: Sauerstoffverbrauch von PETROSELINUM-Zellsuspensionen, gemessen mit einer CLARK-Elektrode, T = 22 - 23 °C, die Suspensionen wurden 5 - 10 min an das Medium äquilibriert. Der Sauerstoffpartialdruck bei t = 0 wurde zu 100 % gesetzt und der Partialdruck nach den angegebenen Zeitinvervallen (anaerobe Bedingungen) darauf bezogen.

Symbole: ▲ - ▲ Experimentalmedium pH 4,7 (Saccharose)
○ - ○ Nährmedium ohne IAA, pH 4,6
● - ● Nährmedium mit 10^{-5} M IAA, pH 4,6
▲ - ▲ Experimentalmedium pH 3,8 (Mannitol ohne IAA)

Abb. 6: Die Bedingungen von Abb. 5 wurden abgeändert: die Zellsuspensionen wurden 60 - 90 min an das Medium äquilibriert (T = 23 °C, kultiviert im Reziprokschüttler bei 130 rpm, in 100 ml (50 ml) Erlenmeyergefäßen).

Symbole: sind identisch mit Abb. 5 , außer
□ - □ Experimentalmedium pH 4,7 (Glucose ohne Hormone)

Die Substratkonzentration betrug immer 90 mM.

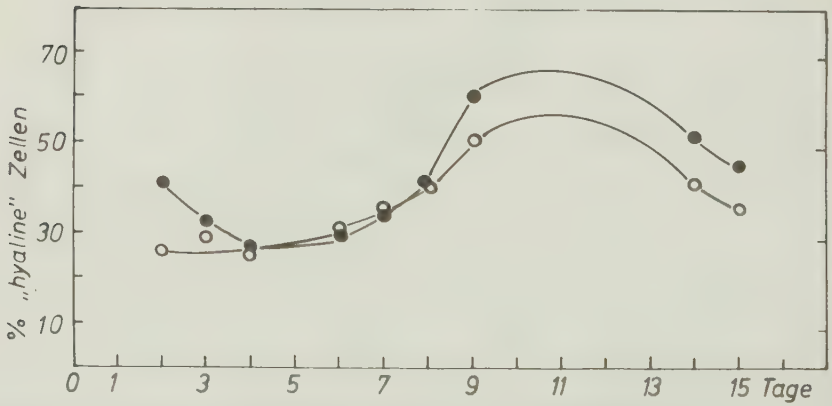


Abb. 7: Anteil der "hyalinen" Zellen an der Gesamtpopulation in % während einer Kulturperiode von PETROSELINUM-Suspensionszellen, Neuinoculation am Tag 6.

3.1.7. Ionengehalte des Mediums

Die Konzentrationsänderungen von K^+, Na^+, NH_4^+, H^+ und Cl^- und die Änderung der Leitfähigkeit des Mediums können auf selektive Ionenabsorption bzw. auf die intrazellulären Ionengehalte während eines Kulturverlaufs hinweisen. Kalium (Abb. 8) und Ammonium (Abb. 9) werden bis zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase fast völlig absorbiert, parallel mit der Zunahme des Trockengewichts. Zum gleichen Zeitpunkt wurde von Chlorid (Abb. 11) etwa 10 - 20 %, von Natrium (Abb. 10) 40 - 60 % der Konzentration bei Neuinoculation absorbiert. Diese Daten stimmen mit den von JONES et al. (1973) überein. Die Absorptionsrate von Ammonium ist ein Maß für die Proliferationsrate bei Suspensionen, Ammoniummangel in der stationären Phase läßt die Zellen altern und verringert die Teilungsrate (BERGMANN et al., 1976, GAMBORG und MILLER, 1968, GAMBORG und SHYLUK, 1970, ROSE und MARTIN, 1974). Nitrat wird erst dann bevorzugt absorbiert, wenn Zellsuspensionen unter Ammoniummangel leiden (HAHLBROCK, 1975 , BERGMANN et al., 1976).

3.1.8. Intrazelluläre Ionengehalte von K^+, Na^+ und Cl^-

Jede Neuinoculation erhöht die Ionengehalte, die Substrat- und Hormonkonzentration und bewirkt nicht nur eine Initiation der Proliferation sondern auch einen vorübergehenden erhöhten Ionengehalt der Zellen. Bei K^+, Na^+ und Cl^- läßt sich nach Neuinoculation ein erhöhter intrazellulärer Ionengehalt feststellen (Abb. 12). Diese z.T. passive Akkumulation ist be-

sonders bei K_i^+ und Na_i^+ deutlich. Q_v-Werte (siehe 2.6.2.) wurden aus den Ionengehalten während der logarithmischen Wachstumsphase (2. - 6. Tag) berechnet, während dieser Phase erhöht sich Na_i^+, K_i^+ bleibt fast konstant und Cl_i^- scheint ebenfalls konstant zu bleiben. Detailliertere Untersuchungen müssen klären, welche Zusammenhänge zwischen intrazellulären Ionenkonzentrationen und Parametern des Wachstums bei der diskontinuierlichen Kulturmethode (Proliferationsrate, pH bzw. Leitfähigkeit bzw. Ionengehalte des Mediums, Substrataufnahme, Nitratstoffwechsel) bestehen.

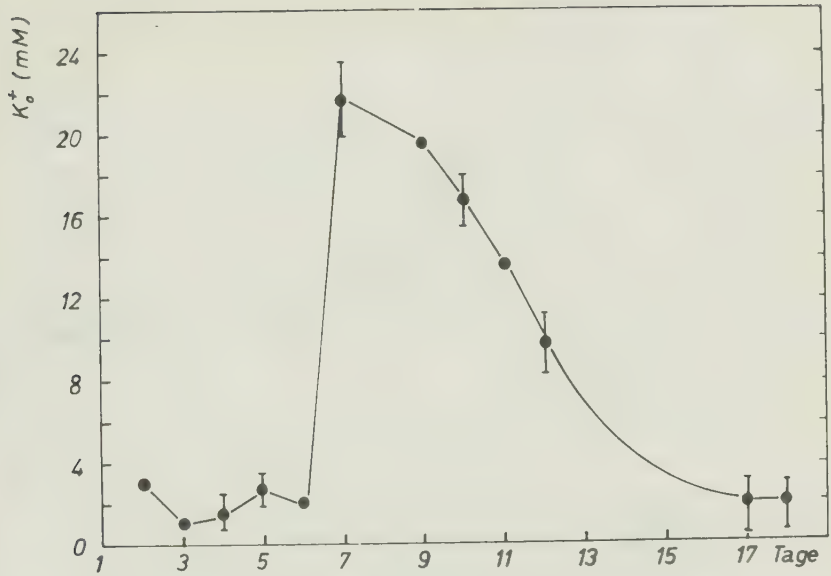


Abb. 8: Veränderung von K_o^+ während einer Kulturperiode von PETROSELINUM-Zellsuspensionen, Neuinoculation am Tag 6.

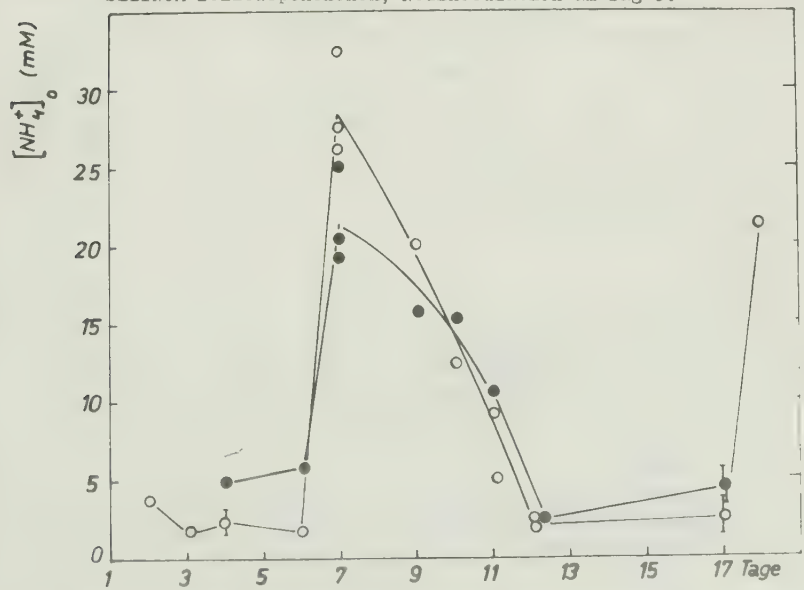


Abb. 9: Veränderung von $[NH_4^+]_o$ während einer Kulturperiode von PETROSELINUM-Zellsuspensionen, Neuinoculation am Tag 6, 17. o - o und ● - ● bedeuten verschiedene Kulturen

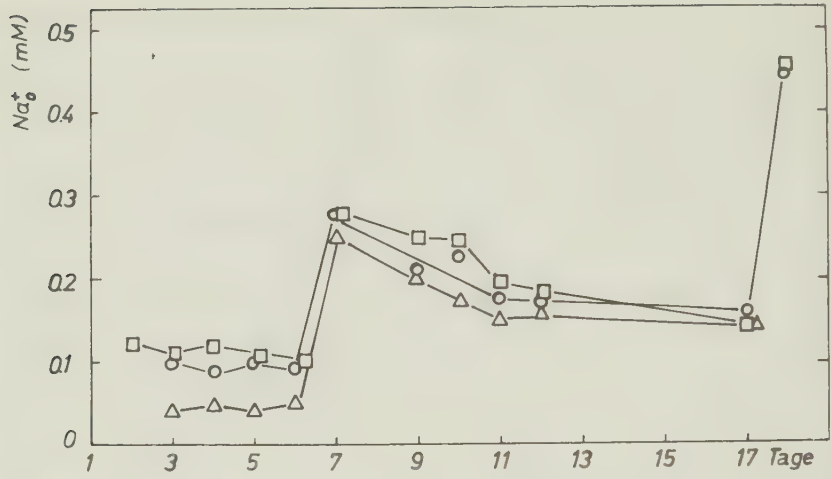


Abb. 10: Veränderung von Na^+_o während einer Kulturperiode von PETROSELINUM-Zellsuspensionen, Neuinoculation am Tag 6. und 17. Symbole o - o, △ — △ , □ — □ , bedeuten verschiedene Kulturen

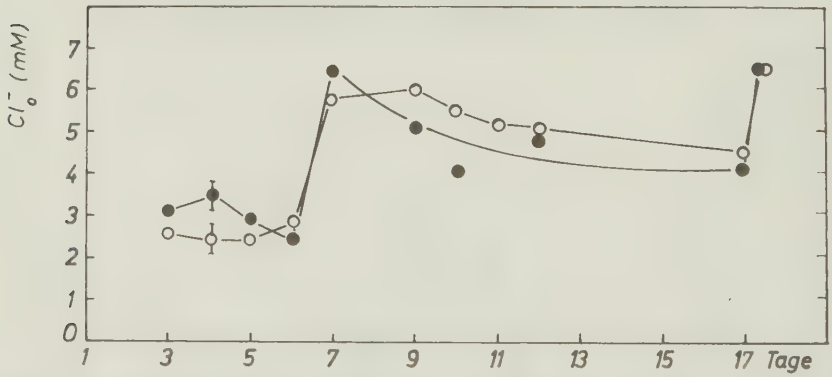


Abb. 11: Veränderung von Cl^-_o während einer Kulturperiode von PETROSELINUM-Zellsuspensionen, Neuinoculation am Tag 6 und 17. o - o und ● - ● sind verschiedene Kulturen.

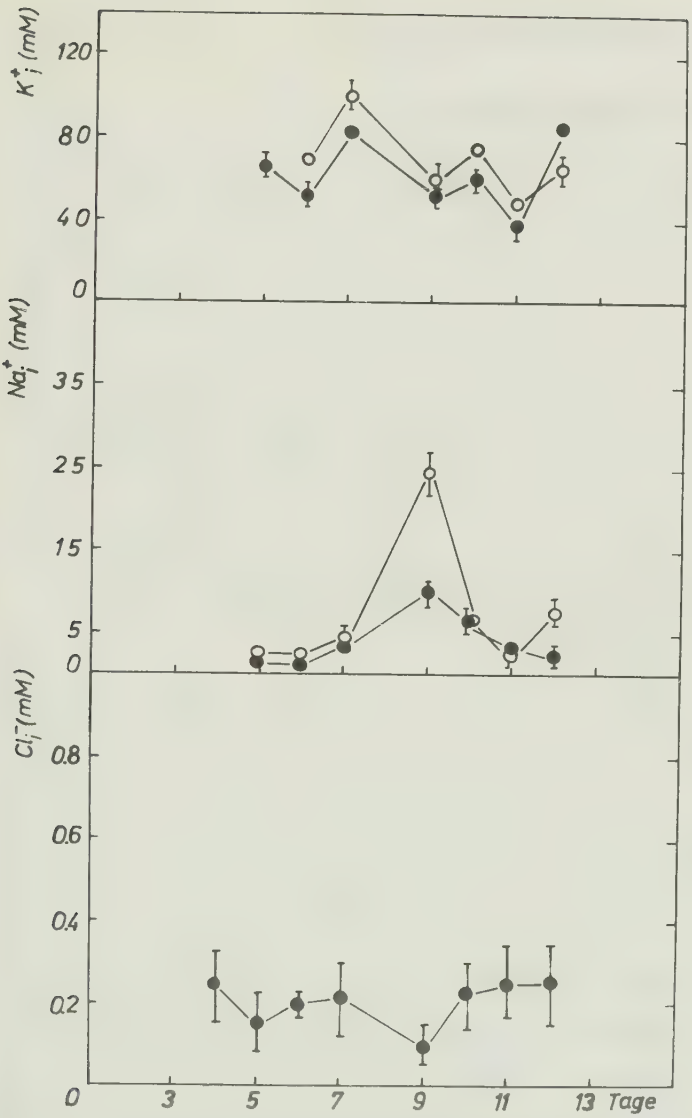


Abb. 12: Veränderung von K^+_i, Na^+_i und Cl^-_i während einer Kulturperiode von PETROSELINUM-Zellsuspensionen, Neuinoculation am Tag 6. o - o und ● - ● bedeuten verschiedene Kulturen (vgl. dazu Abb. 8 - 11).

3.2. Aufnahmekinetiken von IAA (^{3}H-IAA)

3.2.1. Zeitabhängige Aufnahme von IAA

Aufnahmekinetiken (Abb. 13) zeigen, daß ein Flußgleichgewicht der IAA-Aufnahme und -abgabe bei 10^{-7} - 10^{-9} M IAA-Außenkonzentration nach 10 - 20 min, bei 10^{-5} M IAA nach 60 - 120 min erreicht wird. Bei Kulturen in der stationären Wachstumsphase mit einem geringen Anteil proliferierender Zellen wird der steady state später erreicht und die IAA-Aufnahmerate kann bis zu 100 % kleiner sein. Effekte infolge Dekomposition der ^{3}H-IAA und Einwirkungen von IAA-Oxidasen (EPSTEIN et al., 1975) wurden vermieden, indem Aufnahmekinetiken zumeist 60 bis 90 min dauerten.

3.2.2. Abhängigkeit der IAA-Aufnahmerate von der IAA-Außenkonzentration

IAA scheint überwiegend passiv aufgenommen zu werden, die Aufnahmerate verhält sich etwa stöchiometrisch zur Außenkonzentration (1:1 - 2x10^{-5}) bei doppelt-logarithmischer Auftragung (Abb. 14). Das pH-Optimum der IAA- und der phytohormonabhängigen Cl^-- und K^+-Aufnahme liegt bei pH 4 - 5 (vgl. BENTRUP et al., 1973). Wird die Außenkonzentration von NO_3^-, Cl^- und NH_4^+ über den Bereich von 10^{-5} bis 10^{-2} M variiert, wird davon die IAA-Aufnahmerate nicht wesentlich beeinflußt.

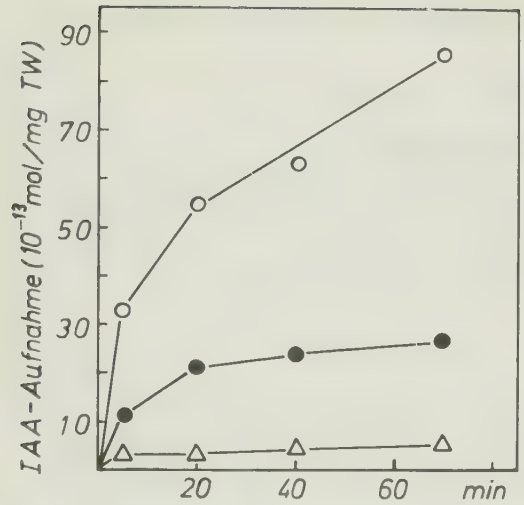


Abb. 13: Zeitabhängige Aufnahmekinetik von IAA (^{3}H-IAA) durch PETROSELINUM-Zellsuspensionen in Experimentalmedium pH 4,8. Symbole: o - o 5×10^{-6} M IAA, ● - ● 10^{-7} M IAA und Δ - Δ 5×10^{-8} M IAA im Medium.

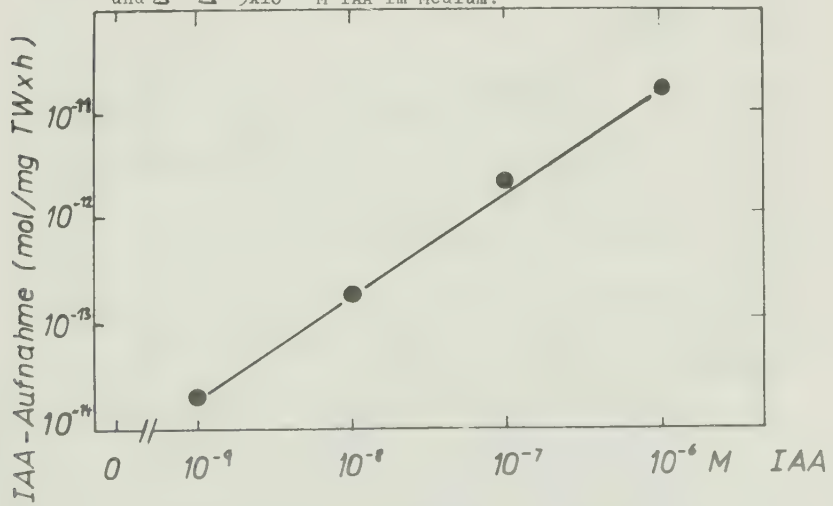


Abb. 14: Abhängigkeit der IAA (^{3}H-IAA)-Aufnahmerate (mol mg $TW^{-1} h^{-1}$) von der IAA-Außenkonzentration bei Zellsuspensionen von PETROSELINUM. Experimentalmedium pH 4,8, 60 min Äquilibr., 60 min Hormonexposition und Inkubation mit ^{3}H-IAA

3.3. Aufnahmeraten von K^+ (^{86}Rb), Na^+ (^{22}Na) und Cl^- (^{36}Cl)

3.3.1. Abhängigkeit der Cl^--Aufnahme von der NO_3^- - und NH_4^+-Konzentration des Mediums

NO_3^- und NH_4^+ tragen in hohem Maße zur Ionenstärke des Nährmediums (40 bzw. 20 mM) und des Experimentalmediums (je 10 mM) bei, als Substrate des Stickstoffwechsels werden sie von proliferierenden Zellen rasch absorbiert (Abb. 9). Nitrat hemmt erst ab 10^{-3} M die Cl^--Aufnahme, und zwar 1 mM NO_3^- etwa 5 - 10 %, 40 mM bis zu 30 %, die IAA-Aufnahmerate wird bei diesen Konzentrationen zu 5 % bzw. 15 % gehemmt. Die geringere Aufnahmerate dürfte weder auf einer Selektivität für Nitrat noch auf metabolischen Effekten beruhen, sondern auf passive Aufnahme zurückzuführen sein. Cl^-, NO_3^- und IAA^- konkurrieren um die Anionenaufnahme.

Im Gegensatz dazu steigert NH_4^+ ab 10^{-3} M die Cl^--Aufnahmerate (Abb. 15). Die IAA-Aufnahmerate bei einer NH_4^+-Konzentration von 10^{-4} - 10^{-1} M liegt bei 10^{-5} M IAA bei $\pm$ $2x10^{-10}$ mol / mg TWxh, bei 10^{-6} M IAA bei $\pm$ $2x10^{-11}$ mol /mg TWxh und bei 10^{-8} M IAA bei $\pm$ $2x10^{-13}$ mol /mg TWxh (vgl. Abb. 17).

Die NH_4^+-stimulierte Cl^--Aufnahme ließe sich durch passive Vorgänge erklären: Cl^- geht passiv mit einer erhöhten NH_4^+ - Aufnahme mit (bzw. NH_3 + H^+), bzw. durch gekoppelte Austauschprozesse (K^+ - Cl^-, Na^+ - Cl^-, etc.)

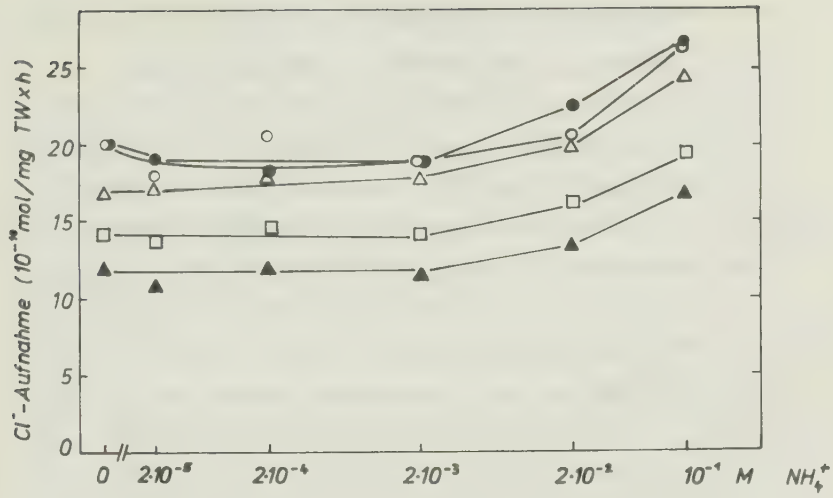


Abb. 15: Abhängigkeit der $Cl^-(^{36}Cl)$-Aufnahmerate (mol mg $TW^{-1}h^{-1}$) von der NH_4^+- und der IAA-Außenkonzentration, weitere Angaben bei Abb. 16.

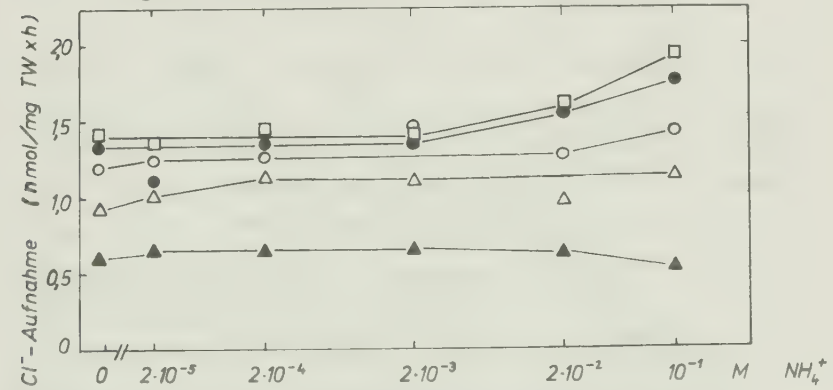


Abb. 16: Abhängigkeit der $Cl^-(^{36}Cl)$-Aufnahmerate (mol mg $TW^{-1}h^{-1}$) von der NH_4^+- und der 2,4-D-Außenkonzentration bei Zell-Suspensionen von PETROSELINUM. Experimentalmedium pH 4,8, 60 min Äquilibration, 60 min Hormonexposition und Inkubation mit ^{36}Cl. Symbole: △ - △ 10^{-5} M IAA (2,4-D), ▲ - ▲ 10^{-6} M IAA (2,4-D), o - o 10^{-7} M IAA (2,4-D), ● - ● 10^{-8} M IAA (2,4-D), □ - □ - ◘ 10^{-6} M IAA+10^{-6} M 2,4-D. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf Abb. 16.

3.3.2. Abhängigkeit der Cl^--Aufnahme von der Cl^--Außenkonzentration

Aus Abb. 17 und Tab. 2 wird ersichtlich, daß ab 10^{-3} M Cl^-_o sich die Cl^--Aufnahmerate erhöht. Ein passiver Vorgang liegt nahe, denn die IAA-Aufnahmerate (bei 10^{-6} M IAA : 2 - 2,5 x10^{-11} mol /mg TWxh) wird bei 6 mM Cl^-_o um 8 %, bei 30 mM Cl^-_o um $\leq$ 30 % gesteigert. Die Daten von Tab. 2 gelten für Äquilibrierungszeiten und Hormoninkubationen von 60 - 70 min bei pH 4,8.

Tab. 2: Steigerung der Cl^--Aufnahme in % ($6x10^{-4}$ M Cl^-_o $\hat{=}$ 100 %) durch Cl^-_o

Cl^-_o (mM)	10^{-6} M IAA	10^{-6} M 2,4-D	IAA/2,4-D je 10^{-6} M	Kontrolle
1,0	130	-	-	-
6,0	170 - 200	150	140	140
30,0	400 - 500	250 - 270	300	300

Bezugswerte:
10^{-6} M IAA $\hat{=}$ 6 x 10^{-10} mol / mg TWxh
10^{-6} M 2,4-D $\hat{=}$ 4 x 10^{-10} mol / mg TWxh
10^{-6} M 2,4-D + IAA $\hat{=}$ 4 x 10^{-10} mol / mg TWxh
Kontrolle $\hat{=}$ 10 x 10^{-10} mol / mg TWxh

3.3.3. Abhängigkeit der Cl^--Aufnahme vom pH des Mediums

In Untersuchungen von HAGER (1971), RAYLE (1973), BATT und WILKINS (1976), THOMSON et al., (1972) und LADO et al., (1976) wurde ein Wirkungsoptimum von Phytohormonen (10^{-5} M) bei pH 4 - 5 gefunden. Der Dissoziationsgrad bzw. die Aktivität der IAA (pK 4.7) hängt vom pH des Mediums ab, Untersuchungen über pH-abhängige Phytohormoneffekte müssen dies berücksichtigen (RUBERY und SHELDRAKE, 1973 , 1974 , RAVEN, 1975). In den Abb. 17 und Abb. 18 werden Aufnahmekinetiken von Cl^- und IAA gezeigt, bei denen der Anteil der undissoziierten IAA (10^{-5} - 10^{-7} M) über den pH-Bereich von 3 - 6 konstant gehalten wurde. Der Anteil undissoziierter IAA bei pH 3 = 100 %. Unter diesen Bedingungen fördert NH_4^+ und Cl^- (je 1 mM) die Cl^--Aufnahme deutlich (vgl. 3.2.1. und 3.2.2.), während 2,4-D (10^{-5} M) die Cl^--Aufnahmerate mindert. Eine erhöhte Cl-Aufnahme im pH-Bereich 3 - 5 bestätigt frühere Ergebnisse (BENTRUP et al., 1973), allerdings dürften Effekte bei pH 3 - 4 auf Zellwand, Plasmalemma und membrangebundene Enzyme eine Analyse und Interpretation erschweren.
In Abb. 18 wird die IAA-Aufnahmerate (bezogen auf den Anteil undissoziierter IAA bei pH 2 - 3) entsprechend zur Cl^--Aufnahmerate dargestellt. Während bei pH 3 (10^{-5} - 10^{-6} M IAA) NO_3^- , NH_4^+ und Cl^- die Aufnahmerate erhöhen, beeinflussen diese Ionen die IAA-Aufnahme ab pH 4 nicht mehr. Sowohl undissoziierte als auch dissoziierte IAA werden passiv aufgenommen, eine Akkumulation bei pH 3 (fast 100 % undissoziierter IAA) kann auf physiologischen Wirkungen beruhen, bzw. auf dem physikalisch-

chemischen Effekt: IAA wird im Cytoplasma dissoziiert, heraustransportierte IAA im Medium sofort undissoziiert, ein geringerer Efflux bewirkt eine höhere Akkumulation.

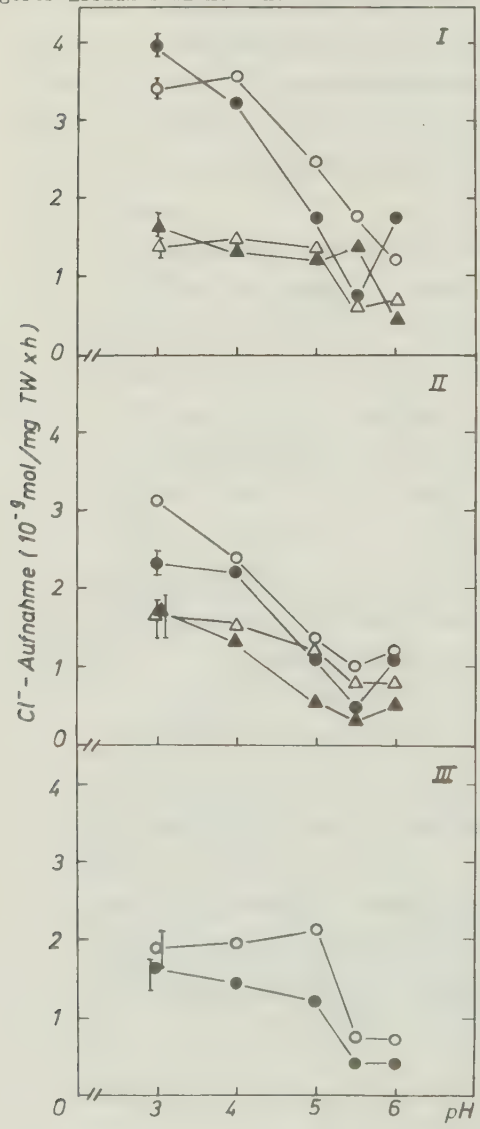


Abb. 17: Abhängigkeit der Cl^-(^{36}Cl)-Aufnahmerate vom pH des Außenmediums, der Anteil der undissoziierten IAA wurde konstant gehalten. Symbole und weitere Erklärungen unter Abb. Nr. 18.

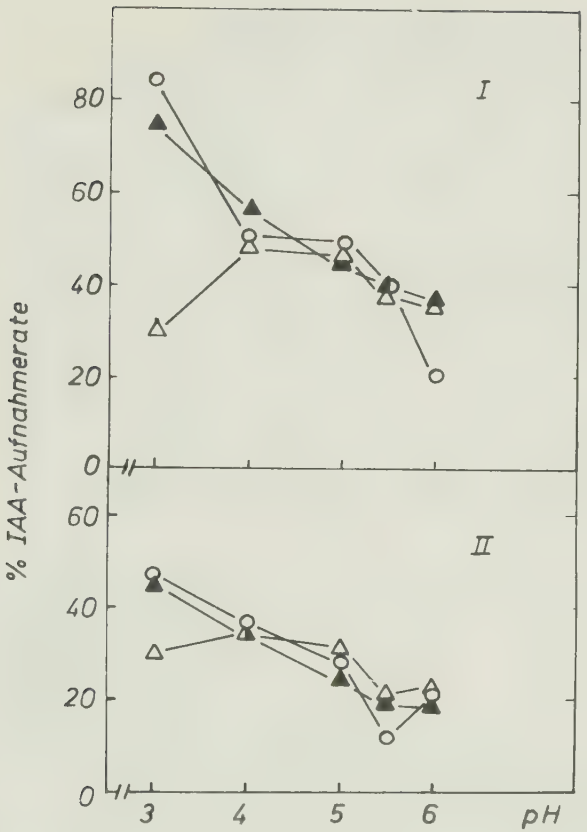


Abb. 18: Abhängigkeit der IAA (^{3}H-IAA) Aufnahmerate vom pH des Experimentalmediums bei Zellsuspensionen von PETROSELINUM. die Aufnahmeraten bei den pH-Werten wurden auf 100 % undissoziierte IAA bezogen (Aktivitätskoeffizient = 1) um die Aufnahme bei verschiedenen IAA-Aktivitäten (pH 3 - 6) vergleichen zu können. Aquilibrationsdauer 70 - 90 min, die Inkubationsdauer von IAA (^{3}H-IAA) und ^{36}Cl für Abb. 17 betrug 60 min.

Bedingungen für Abb. 17 und Abb. 18: I - 10^{-5} M IAA, II - 10^{-6} M IAA, III - 10^{-7} M IAA im Außenmedium.
Symbole: △ — △ + IAA, ▲ - ▲ + IAA mit gleichmolarer 2,4-D,
○ - ○ IAA mit NH_4^+ und Cl^- (beide 1 mM),
● - ● IAA mit NO_3^- und Cl^- (beide 1 mM),

3.3.4. Lag-Phase der Hormonwirkung auf Ionenflüsse

Kennzeichnend für IAA-Aufnahmekinetiken ist das Erreichen des steady state der IAA-Flüsse bereits nach 20 - 30 min bei 10^{-6} bis 10^{-8} M IAA, wenn IAA schnelle Effekte bewirkt, muß eine lag-Phase von 5 - 10 min angenommen werden. Plausibel wird diese Vermutung aufgrund einer günstigen Volumen-Oberflächenrelation, schneller passiver Absorptionsvorgänge und einer hohen Stoffwechselaktivität bei Suspensionszellen. Aus Abb. 19 und 20 wird ersichtlich, daß bereits 10 - 20 min nach Hormonapplikation die Aufnahmeraten (apparente Influxe) ihr Maximum erreicht haben, von 20 - 60 min die Rate sich nicht wesentlich erhöht und 60 - 120 min Hormonwirkungsdauer eine verringerte apparente Cl^-- und Na^+-Aufnahme bewirkt.

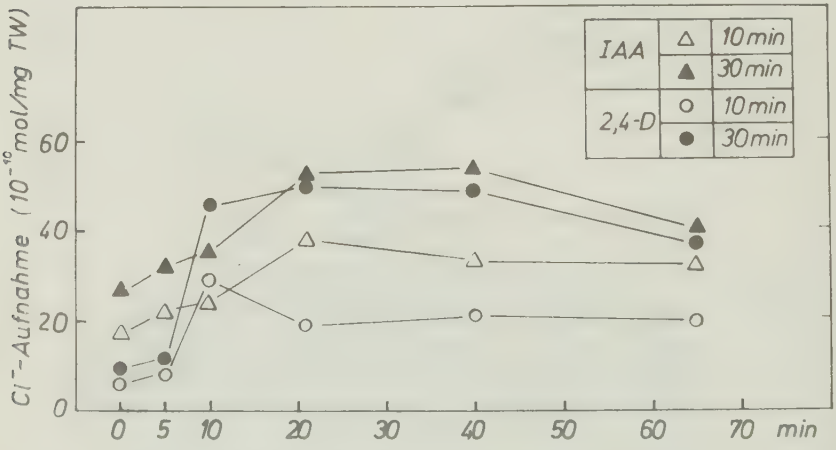


Abb. 19: Wirkung der Hormonexposition (10^{-5} M IAA bzw. 2,4-D) auf die Cl^- (^{36}Cl)-Aufnahme bei PETROSELINUM-Zellsuspensionen. Die Dauer der Hormonexposition vor der Markierung mit ^{36}Cl ist auf der Abszisse aufgetragen. 10 bzw. 30 min nach der Tracerzugabe wurde die apparente Aufnahme gemessen (s. Kasten). Weitere Angaben bei Abb. 20.

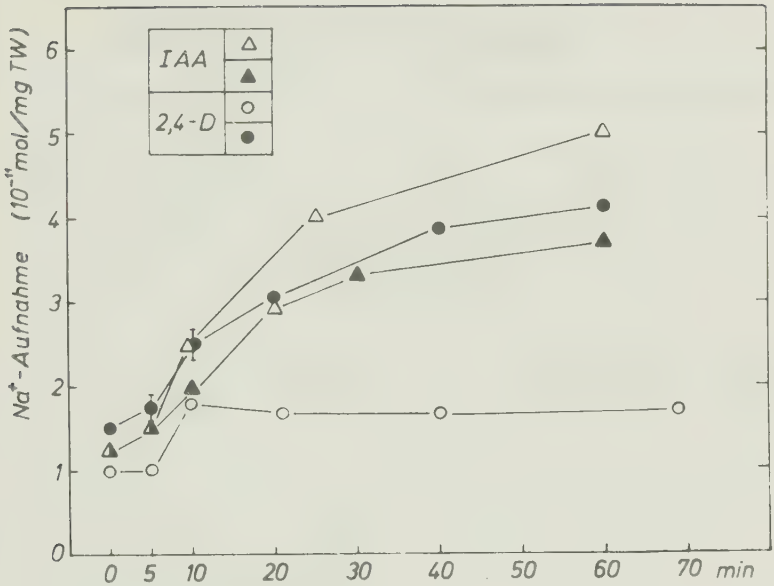


Abb. 20: Wirkung der Hormonexposition (10^{-5} M IAA bzw. 2,4-D) auf die Na^+ (^{22}Na)-Aufnahme bei PETROSELINUM-Zellsuspensionen (in Abb. 19 und 20 1h Äquilibrierung in Experimentalmedium bei pH 4,8). Die Dauer der Hormonexposition vor der Markierung mit ^{22}Na ist auf der Abszisse aufgetragen.

Messung der Na^+ (^{22}Na)-Aufnahme:

▲ - ▲ - ▲ 10 min nach Tracerzugabe (10^{-5} M IAA)

△ - △ - △ 10 min nach Tracerzugabe (10^{-6} M IAA)

o - o - o 10 min nach Tracerzugabe (10^{-5} M 2,4-D)

● - ● - ● 30 min nach Tracerzugabe (10^{-5} M 2,4-D).

In den Abb. 19 und 20 sind keine Kontrollwerte eingezeichnet. Durch Abb. 15 - 17 und Tab. 3 wird bestätigt, daß die Kontrollwerte über den Hormonwerten liegen.

3.3.5. Abhängigkeit der Ionenaufnahme von der IAA-Konzentration

In Tab. 3 sind Daten aus verschiedenen Experimenten zu vergleichbaren Bedingungen zusammengestellt, sie zeigen die Abhängigkeit der Ionenaufnahme von der IAA-Außenkonzentration.

Tab. 3: Minderung der Ionenaufnahme in Abhängigkeit von der IAA-Außenkonzentration nach 60 min Hormonexposition und 60 min Äquilibration. Kontrollwerte = 100 % [1].

IAA-Konzentration in M	Kalium	Natrium	Chlorid
10^{-5}	69 ± 8,5	43 ± 4,4	60 ± 18,2
10^{-6}	-	55 ± 16,2	80 ± 21,4
10^{-7}	-	63 ± 17	90 ± 24
10^{-8}	-	67,5 ± 18	100 ± 26,8
10^{-9}	-	71 ± 19	-
Kontrolle	100	100	100

[1] 100 % Aufnahmeraten der Kontrollwerte in pmol/mg TWxh

K^+ = 73500 ± 9190

Na^+ = 197 ± 70

Cl^- = 3375 ± 1468

3.4. Wirkung der 2,4-D auf die IAA- und Ionenaufnahme

3.4.1. Wirkung der 2,4-D auf die IAA-Aufnahmerate

Bei gleichzeitiger Applikation von IAA und 2,4-D wurde eine geringere Cl^--Aufnahmerate, verglichen mit gleichmolarer IAA-abhängiger Aufnahme, gemessen; es lag nahe, die IAA-Aufnahme unter 2,4-D-Einwirkung zu untersuchen. 2,4-D verringert die IAA-Aufnahme (vgl. RUBERY und SHELDRAKE, 1974). Bei Suspensionskulturen ist das Ausmaß der 2,4-D-Wirkung vom Kulturalter und von der Hormonvorinkubation abhängig. Bereits 20 - 30 min nach 2,4-D-Applikation wird die IAA-Aufnahme fast maximal gehemmt (Tab. 4), wird länger als 120 min vorinkubiert, nimmt die Wirkung der 2,4-D ab. In Tab. 4 sind Messungen aus verschiedenen Experimenten zusammengestellt, es wird dabei der Effekt auf gleichmolare IAA verglichen (genaugenommen müssen z.B. für Dosis-Effekt-Beziehungen Phytohormone mit etwa gleichem pK oder gleichen Aktivitäten verglichen werden).

Tab. 4: 2,4-D-Wirkung auf die IAA-Aufnahmerate [1)]

2,4-D-Konz.	IAA-Konz.	% Hemmung durch 2,4-D
10^{-5} M	10^{-5} M	10
10^{-6}	10^{-6}	13 - 20
10^{-6}	10^{-7}	25
10^{-7}	10^{-7}	10
10^{-8}	10^{-8}	20 - 40

1) 100 % Aufnahmeraten in pmol/mg TWxh

10^{-5} M IAA $\triangleq$ 200, 10^{-6} M IAA $\triangleq$ 16 - 30,
10^{-7} M IAA $\triangleq$ 2 - 4, 10^{-8} M IAA $\triangleq$ 0,1 - 0,2.

3.4.2. Abhängigkeit der Cl^--Aufnahme von der 2,4-D-Konzentration

Abb. 16 zeigt den Einfluß der 2,4-D (10^{-5} - 10^{-8} M) und der NH_4^+-Außenkonzentration (10^{-5} - 10^{-1} M) auf die Cl^--Aufnahme (unter gleichen experimentellen Bedingungen wie in Abb. 15). Übereinstimmend mit anderen Resultaten (Abb. 17 und Abb. 18) bewirkt 2,4-D eine geringere Cl^--Aufnahme; sie kann durch erhöhten Efflux aus dem Cytoplasma (analog zum erhöhten IAA-Efflux) erklärt werden. Bei gleichzeitiger Applikation von IAA und 2,4-D wird die Cl^--Aufnahme - verglichen mit gleichmolarer IAA - um 10 - 20 % verringert. Bei pH 3 - 4 wird manchmal eine durch 2,4-D bewirkte höhere Cl^--Aufnahme gemessen, bei pH 4 bis 5 ist sie - verglichen mit gleichmolarer IAA - um 20 - 40 % geringer. Unklar ist noch, wie der pK von 2,4-D (2,8 - 3,0) bei hohem pH auf die Transportraten von Ionen wirkt und ob er pH-Effekte verstärkt.

3.4.3. Lag-Phase der 2,4-D-Wirkung auf die Ionenaufnahme

Die lag-Phase der Hormonwirkung auf Transportraten von Na^+ und Cl^- liegt bei 5 - 10 min (vgl. Abb. 19,20), 10 - 30 min nach 2,4-D-Applikation werden annähernd maximale Aufnahmeraten erreicht und 60 - 120 min nach Applikation wird eine verringerte Na^+- und Cl^--Aufnahme gemessen. Diese Übergangseffekte sind auf anfänglich überhöhte Werte von S_c^* und Q_c^* (für S_v^*, Q_v^* trifft dies wegen der HWT von mehr als 4 - 6 h der Vakuolenphase weniger zu) zurückzuführen, die geringeren S_c^*- und Q_c^* -Werte nach längerer Hormonapplikation können mit einem erhöhten Ionenefflux aus dem Cytoplasma erklärt werden.

4.0. Kompartmentanalyse

4.1. Einfluß der Inkubationsdauer von Nukliden und Hormonen auf die Effluxraten

Eine Kompartmentanalyse bei Suspensionszellen ist nur dann zuverlässig und kann nach den Rechenvorschriften der Differentialgleichungen (4), (5) und (6) berechnet werden, wenn die Zellen trotz vorübergehender Effekte von Phytohormonen und veränderter Kulturbedingungen im quasi-steady state der Ionenflüsse sind. Aus Influxexperimenten kann anhand von I_c und I_v-Werten (wenn sie über eine längere Inkubationsdauer konstant bleiben) der quasi-steady state abgeschätzt werden. Trotzdem muß die günstigste Aufladezeit experimentell gefunden werden, denn je nach Aufladezeit verändert sich die Relation $S_c^* : S_v^*$, $Q_c^* : Q_v^*$, sowie die Größe des gemessenen Influxes (Φ_{in}^*) bzw. Effluxes (Φ_{ex}^*) für K^+, Na^+ und Cl^-. Die geforderte Aufladezeit von $> 10 \times HWT_c$ aber kleiner als HWT_v (CRAM, 1968, PIERCE und HIGINBOTHAM, 1970, WALKER und PITMAN, 1976) muß für alle untersuchten Ionen gefunden werden. Bei Kompartmentanalysen (K^+ und Cl^-) in früheren Jahren (PFRÜNER, 1972) wurde 12 - 24 h "aufgeladen". Experimente (Abb. 24, 25) in denen die Inkubations- und Äquilibrationsdauer von Nukliden und Hormonen über den Zeitraum von 1 - 7 h variiert wurde, zeigten aber, daß bereits nach 4 - 7 h ein quasi-steady state erreicht wird. Die Werte von S_c^*, S_v^*, Q_c^*, Q_v^* und damit die meisten unidirektionalen Flüsse

sind nach einer Aufladezeit von 4 h sowohl bei IAA-Applikation (10^{-5} M) als auch bei Kontrollexperimenten im quasi-steady state. Effekte, verursacht durch veränderte Äquilibrations- und Kulturbedingungen oder Schockeffekte (THELLIER et al., 1976) scheiden damit aus, zumindest liegen sie nicht in diesem Zeitraum. Bei Auflade- und Applikationszeiten von 1 - 2 h sind die Zellsuspensionen nicht im quasi-steady state, denn der Übergangseffekt der Hormonwirkung auf die Transportraten von K^+, Na^+ und Cl^- beginnt erst abzuklingen und k_v und I_v wird unzuverlässig bestimmt, dasselbe gilt auch für Kontrollexperimente. Der Isotopengehalt von Q_c ist nach 60 - 120 min aufgrund der hohen k_c-Werte bereits in der Sättigung (da $S_o^* = S_c^*$), die Spezifität der Vakuole (bzw. Q_v^*) noch sehr gering, da aber die Bestimmung von I_c, k_c von zuverlässigen Werten I_v, k_v abhängt, sind alle unidirektionalen Flüsse schwieriger zu bestimmen.

In den Abb. 21 - 23 werden Auswaschkinetiken von K^+ (^{86}Rb), Na^+ (^{22}Na) und Cl^- (^{36}Cl) unter quasi steady-state Bedingungen dargestellt (t_{in} = 4 h, T = 23 - 26 °C, Äquilibration bei 120 rpm im Reziprokschüttler). Für die graphische Auftragung wurden die Werte nicht auf mg TW bezogen, erst bei den Berechnungen der Kompartmentanalyse wurde auf mg TW umgerechnet. Die Funktionen ($y = I\, e^{-kt}$) der Kinetiken für die jeweiligen Kompartimente sind angegeben, I wird in dpm berechnet.

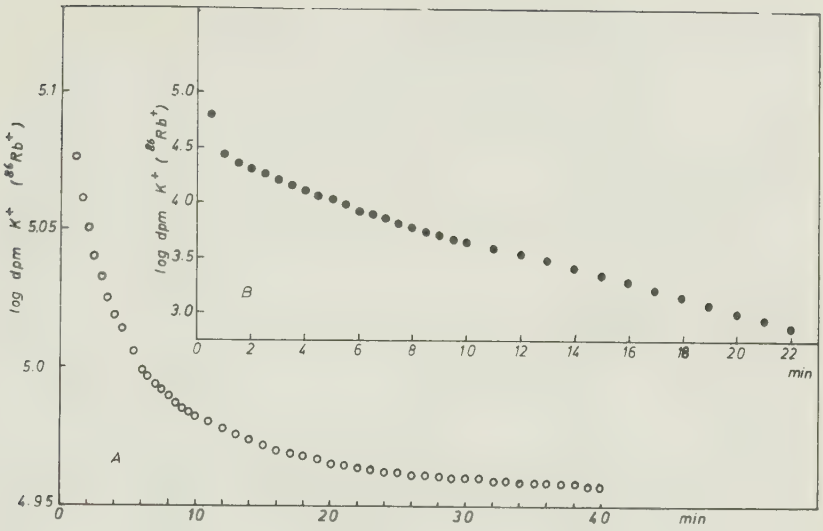


Abb. 21: ^{86}Rb-Efflux (als K^+-tracer) in das nichtmarkierte Experimental-Außenmedium, weitere Angaben bei Abb. 23.

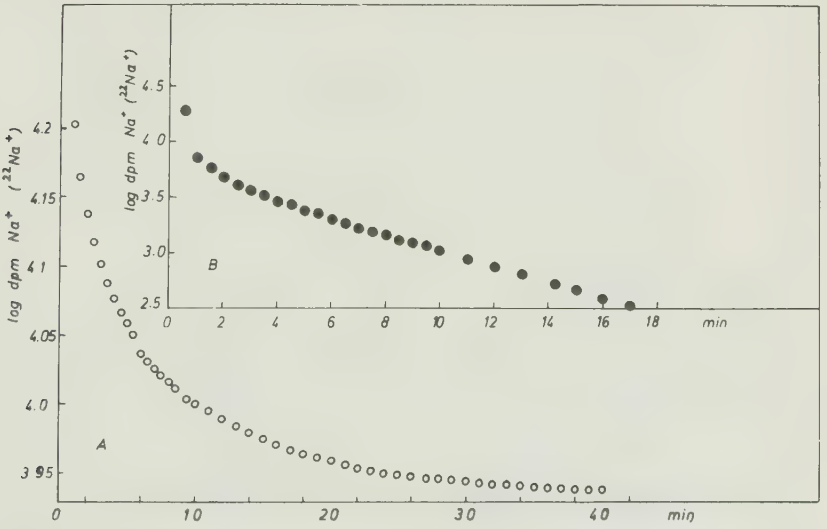


Abb. 22: ^{22}Na-Efflux (als Na^+-tracer) in das nichtmarkierte Experimental-Außenmedium, weitere Angaben bei Abb. 23.

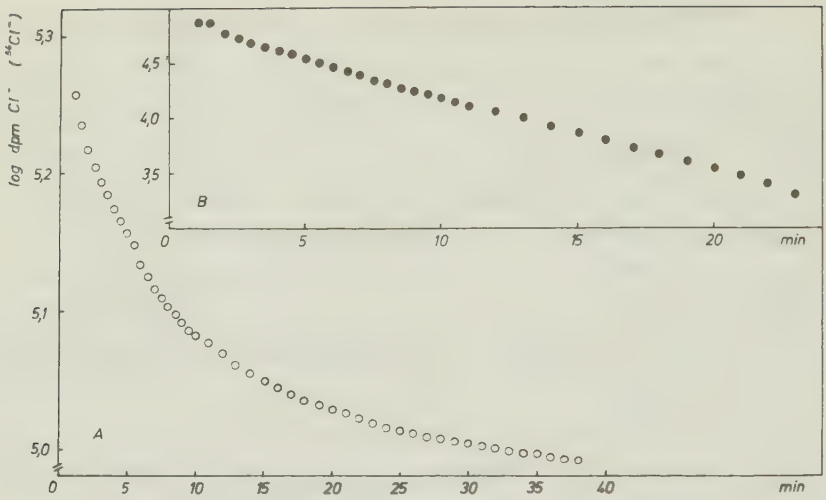


Abb. 23: ^{36}Cl-Efflux (als Cl^--tracer) ins nichtmarkierte Experimental-Außenmedium, Aufladezeit 4 h bei 23-26 °C unter quasi-steady state Bedingungen; das Medium der PETROSELINUM-Zellsuspension enthielt keine Phytohormone. Die Aktivität pro Probe wird zur Restaktivität der Zellen hinzuaddiert, zu jeder Zeit t_i kann die Gesamtaktivität Q_T^* der Zellprobe gemessen werden; die Gesamtaktivität wird in log dpm gegen die Zeit aufgetragen. Das eingeschobene Diagramm B stellt die Auswaschkinetik des Cytoplasmas dar. Nähere Erläuterungen zum Vorgehen und zur Kompartmentanalyse unter 2.5 und 2.6.

Funktionen der Auswaschkinetiken für die Kompartimente zu Abb. 21 - 23:

^{86}Rb (K^+): $y_v = 92019 \text{ dpm } e^{-6,3.10^{-6} t}$, r = 1,0
$y_c = 18822 \text{ dpm } e^{-2,47.10^{-3} t}$, r = 0,998

^{22}Na (Na^+): $y_v = 9060 \text{ dpm } e^{-1,83.10^{-5} t}$, r = 0,964
$y_c = 5025 \text{ dpm } e^{-2,7 .10^{-3} t}$, r = 0,999

^{36}Cl (Cl^-) $y_v = 130520 \text{ dpm } e^{-4,17.10^{-5} t}$, r = 0,999
$y_c = 74500 \text{ dpm } e^{-2,53.10^{-3} t}$, r = 0,997

Die Funktion $y = I_{t=0} \; e^{-kt}$ wird in 2.5 und 2.6. erläutert.

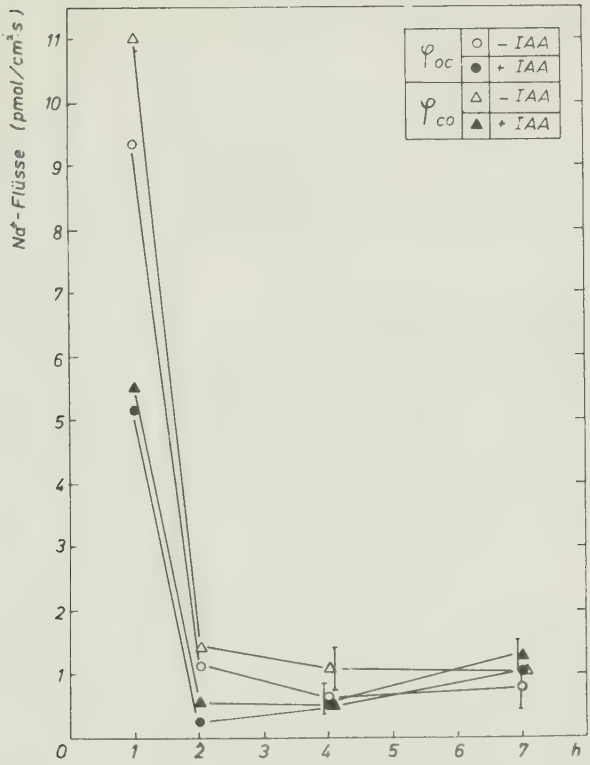


Abb. 24: Abhängigkeit der Na^+ (^{22}Na)-Flüsse am Plasmalemma (φ_{oc}, φ_{co}) bei PETROSELINUM-Zellsuspensionen von der Aquilibrations- und Aufladezeit t_{in}. Das Medium (Experimentalmedium pH 4,5) enthielt 10^{-5} M IAA bzw. keine Phytohormone (s. Kasten). Weitere Erläuterungen unter Abb. 25.

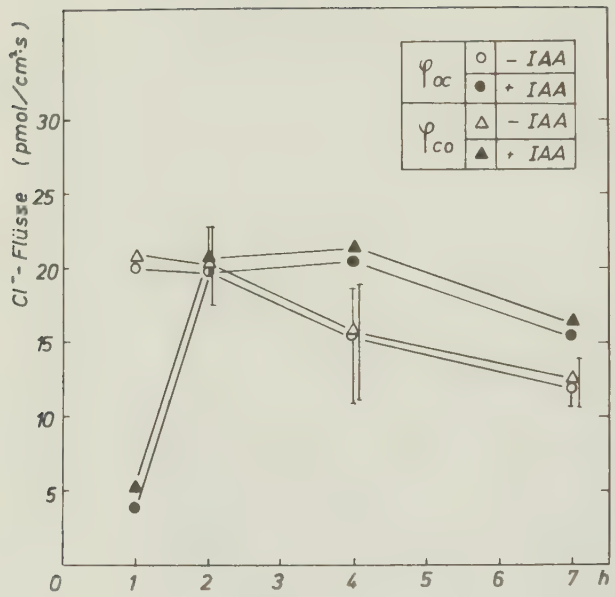


Abb. 25: Abhängigkeit der Cl^- (^{36}Cl)-Flüsse am Plasmalemma (φ_{oc}, φ_{co}) bei PETROSELINUM-Zellsuspensionen von der Äquilibrations- und Aufladezeit t_{in}. Das Experimentalmedium (pH 4,8) enthielt 10^{-5} M IAA bzw. keine Phytohormone (s. Kasten). Bei einer Aufladezeit von 1 bis 2 h war S_v^* für eine Flußanalyse zu gering (s. Diskussion 5.2. und 5.3.). Es wurden für Experimente mit und ohne IAA zu hohe Plasmalemmaflüsse berechnet.

4.2. Dosis-Effekt-Beziehung für IAA-abhängige Plasmalemmaflüsse von K^+ und Cl^-

Aufnahmeversuche (vgl. Abb. 15, 16, 19 und 20) bewiesen, daß die Hormonkonzentration und Dauer der Applikation die Größe der phytohormon-bewirkten Erhöhungen der Flußraten von K^+, Na^+ und Cl^- entscheidend beeinflußt. Dosis-Effekt-Relationen für solche - durch Phytohormone (IAA 10^{-5} - 10^{-8} M) verursachte - erhöhte Flußraten am Plasmalemma sind in den Abb. 26 und 27 dargestellt (Hormonwirkung 30 min, quasi-steady state für K^+- und Cl^--Flüsse). Die am bzw. im Plasmalemma und Cytoplasma gemessenen Größen φ_{oc}, φ_{co}, Q_c erweisen sich als direktes Kriterium für Hormonwirkungen, während die Werte von Q_v, φ_{cv} und φ_{vc} über den Zeitraum von 60 - 120 min nach Hormonapplikation fast konstant bleiben.

Mit diesen Daten können die durch IAA und 2,4-D verursachten geringeren Aufnahmeraten (z.B. bei 10^{-5} M verglichen mit Kontrollwerten) von Na^+, Cl^- und IAA erklärt werden:

- während der Aufladezeit und Inkubationszeit für Hormone (60 - 120 min) werden infolge hoher Plasmalemmaflüsse S_c^* und Q_c^* anfänglich sehr hoch (S_v^* und Q_v^* können bei kurzen Aufnahmezeiten vernachlässigt werden); zugleich verringert ein einsetzender Nettoefflux S_c^* und Q_c^* , d.h. eine geringere apparente Aufnahme wird gemessen;
- 60 - 120 min nach Applikation der IAA verringert sich der Dosis-Effekt und die Flußraten nähern sich dem steady state (vgl. Abb. 31 -33).

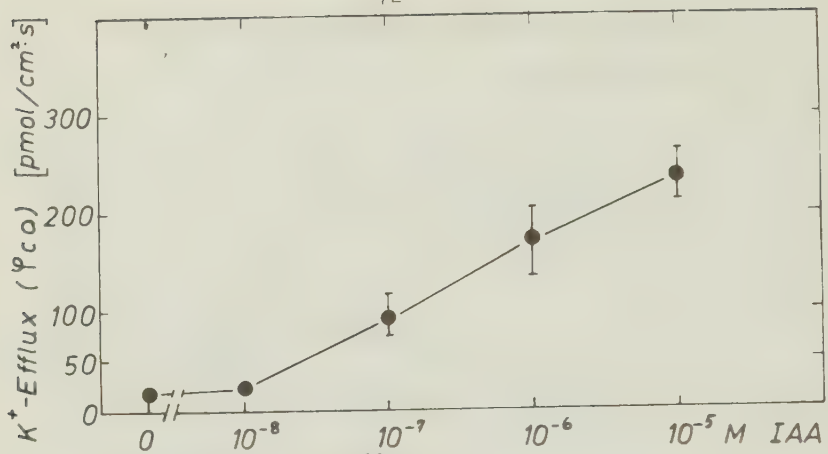


Abb. 26: Abhängigkeit der K^+ (^{86}Rb)-Effluxrate (φ_{co}) von der IAA-Außenkonzentration, weitere Angaben bei Abb. 27.

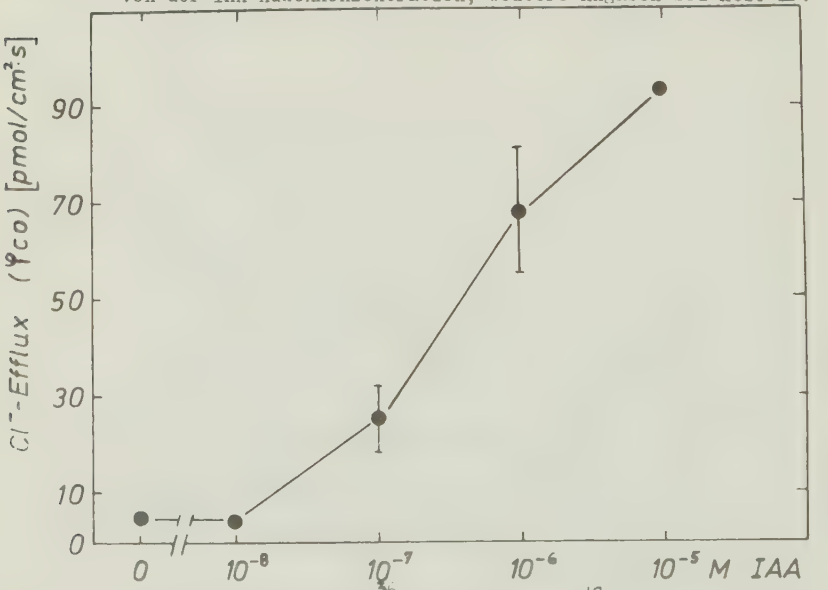


Abb. 27: Abhängigkeit der Cl^- (^{36}Cl)-Effluxrate (φ_{co}) von der IAA-Außenkonzentration bei PETROSELINUM-Suspensionszellen, t_{in} 12 h, Hormonexposition 3o min.

4.3. Übergangseffekte von Phytohormonen auf Flüsse am Plasmalemma und am Tonoplast

Bei Aufnahmeversuchen wurden - abhängig von der Dauer der Hormonapplikation - Übergangskinetiken festgestellt (Abb. 19, 20). Dazu entsprechend wurden Effluxexperimente durchgeführt um die Zeitspanne bis zum Wirksamwerden der Hormone auf Flüsse (φ_{oc}, φ_{co}, φ_{cv}, φ_{vc}) einzugrenzen und den Verlauf der Übergangsphase bei K^+-, Na^+ und Cl^--Flüssen zu bestimmen. In der Tab. 5 sind die Wirkungen von IAA und 2,4-D auf K^+-, Na^+- und Cl^--Flüsse am Plasmalemma dargestellt, zum Vergleich in Tab. 6 die Halbwertszeiten für K^+-, Na^+- und Cl^--Flüsse im quasi-steady state.

Tab. 5: Übergangseffekte von Phytohormonen auf Plasmalemmaflüsse

Ion	Hormon 10^{-5} M	Zeitspanne bis zur Wirkung	maximale Flußrate während	Ende der Übergangsphase
K^+	IAA	10 min	30 - 60 min	nach 120 min
	2,4-D	10 min	10 - 60 min	n. 120 min
Na^+	IAA	30 min	bei 60 min	n. 120 min
	2,4-D	10 min	10 - 60 min	n. 120 min
Cl^-	IAA	10 min	30 - 60 min	n. 120 min
	2,4-D	10 min	30 min	n. 60 min
Kontrolle	keine Übergangsphasen bei vergleichbarer Aufladezeit und Dauer der Äquilibration.			

Tab. 6 Halbwertszeiten für K^+-, Na^+- und Cl^--Flüsse unter quasi-steady state-Bedingungen; Daten aus Effluxexperimenten (vgl. Abb. 21-23, 28 - 30).

Ion	Hormon 10^{-5} M	HWT_c s	HWT_v s
K^+	IAA	180 - 200	12000 - 30000
	2,4-D	140 - 180	20000
	Kontrolle	240 - 280	18000 - 30000
Na^+	IAA	100 - 120	20000
	2,4-D	120 - 140	20000 - 22000
	Kontrolle	240 - 270	15000 - 20000
Cl^-	IAA	200 - 240	15000 - 20000
	2,4-D	180 - 220	10000 - 15000
	Kontrolle	270 - 300	10000 - 15000

IAA und 2,4-D sind ionenspezifisch: IAA scheint mehr auf die Kationen-, 2,4-D mehr auf die Anionenflüsse zu wirken, zusätzlich ist der Übergangseffekt bei IAA und 2,4-D spezifisch ausgeprägt: IAA hat eine anhaltendere Wirkung als 2,4-D. Nach 120 - 240 min - zum Ende des Übergangseffekts - nähern sich die Flußraten dem steady state der Kontrollen ohne Hormone. In den Abb. 28 - 30 sind Effluxkinetiken dargestellt (K^+, Na^+, Cl^-), die den Effekt einer kurzen 2,4-D-Exposition auf die Plasmalemmaflüsse zeigen. Die Abhängigkeit der Effluxraten am Plasmalemma von der Hormonexposition (10 - 420 min), und zwar von 10^{-5} M IAA und 2,4-D, ist in den Abb. 31 - 33 vor allem für 10 - 60 min Hormonexposition klar aufgezeigt.

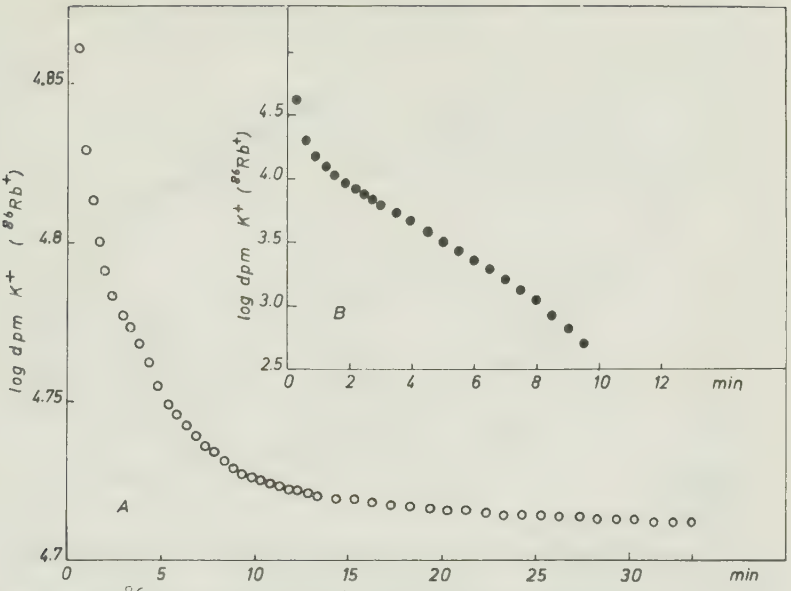


Abb. 28: ^{86}-Rb-Efflux (als K^+-tracer) in das nichtmarkierte Experimentalmedium bei PETROSELINUM-Zellsuspensionen, weitere Angaben bei Abb. 30.

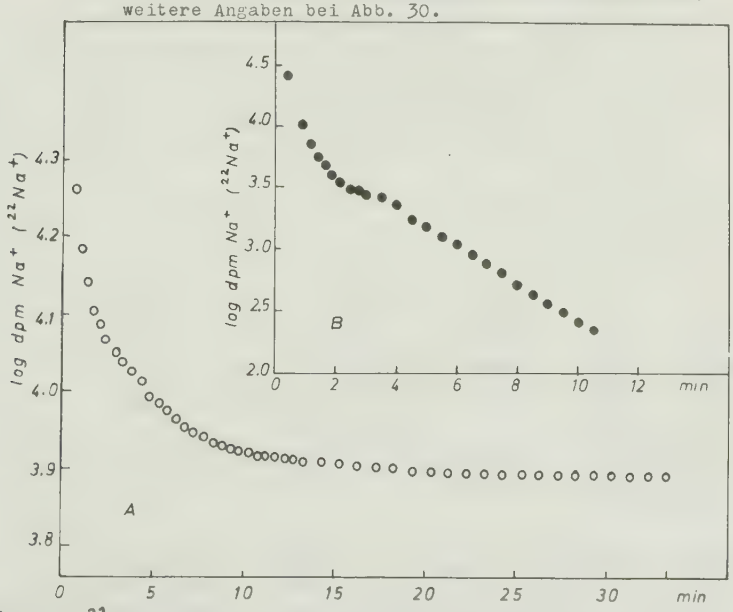


Abb. 29: ^{22}Na-Efflux in das nichtmarkierte Außenmedium bei PETROSELINUM-Suspensionskulturen, weitere Angaben bei Abb. 30.

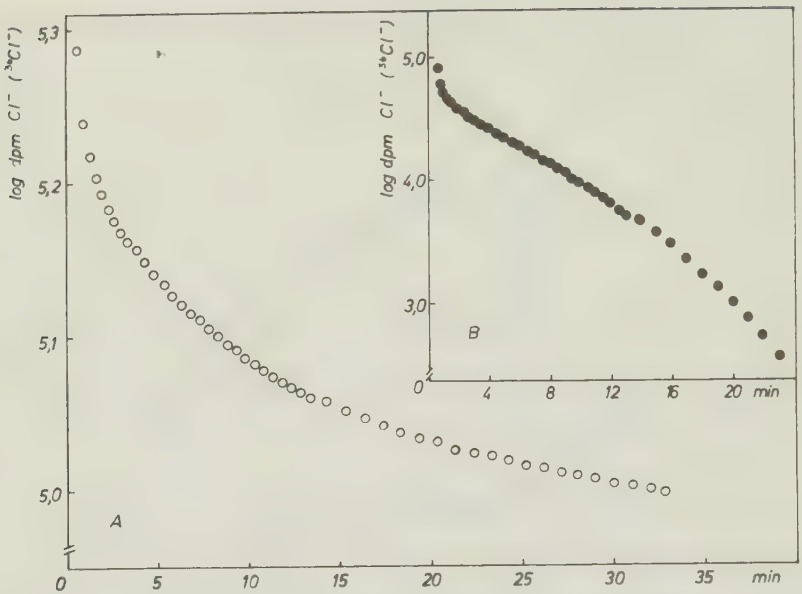


Abb. 30: ^{36}Cl-Efflux in das nichtmarkierte Experimental-Außenmedium bei PETROSELINUM-Zellsuspensionen.

Die Effluxkinetiken in Abb. 28 - 30 wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt: Äquilibration und Aufladezeit 4 h, Hormonexposition von 10 min durch 2,4-D (10^{-5} M) vor Beginn des Auswaschens um Übergangskinetiken der Cytoplasmaphase (eingeschobenes Diagramm B) zu messen, nähere Erläuterungen unter 2.5 und 2.6.

Funktionen der Auswaschkinetiken für die Kompartimente zu den Abb. 28 - 30:

^{86}Rb (K^+): $y_v = 53362\ e^{-2,195 \cdot 10^{-5}\ t}$, $r = 0,98$

$y_c = 17394\ e^{-5,68\ .10^{-3}\ t}$, $r = 0,999$

^{22}Na (Na^+) $y_v = 8244\ e^{-3.41.10^{-5}\ t}$, $r = 0,987$

$y_c = 8641\ e^{-5,87.10^{-3}\ t}$, $r = 0,999$

^{36}Cl (Cl^-) $y_v = 126060\ e^{-7,79.10^{-5}\ t}$, $r = 0,999$

$y_c = 55286\ e^{-3,0\ .10^{-3}\ t}$, $r = 0,998$

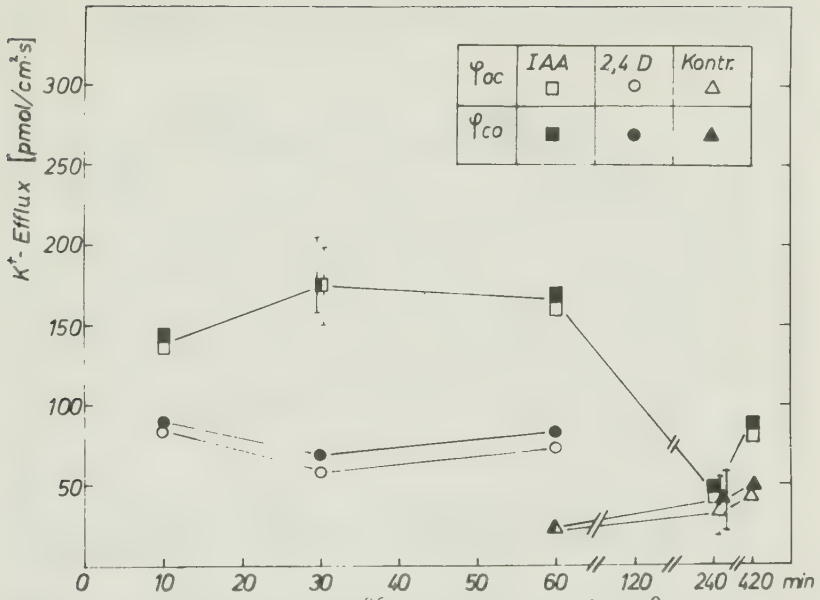


Abb. 31: Abhängigkeit der K^+ (^{86}Rb)-Effluxraten (φ_{co}, φ_{oc}) von der Dauer der Hormonexposition vor dem Auswaschen mit nichtmarkiertem Experimentalmedium, siehe bei Abb. 33

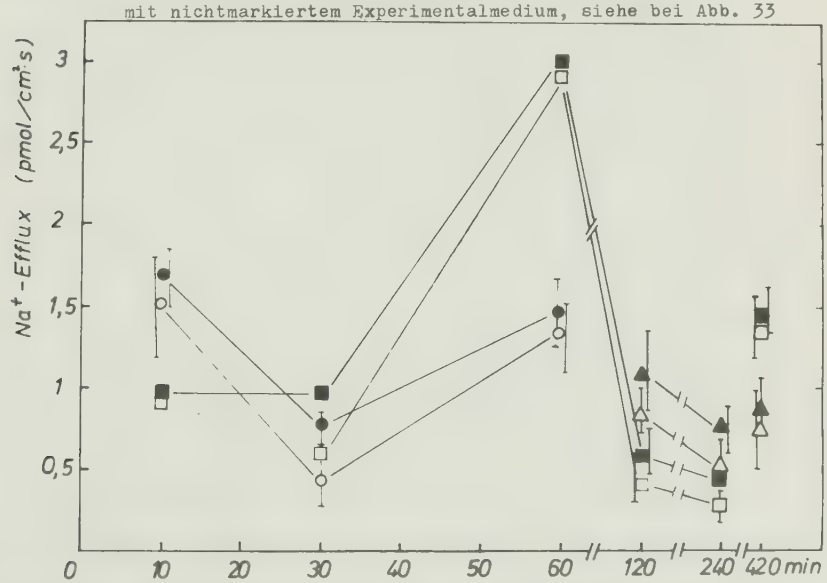


Abb. 32: Abhängigkeit der Na^+ (^{22}Na)-Effluxraten (φ_{co}, φ_{oc}) von der Hormonexposition vor dem Auswaschen mit nichtmarkiertem Experimentalmedium, weitere Angaben bei Abb. 33

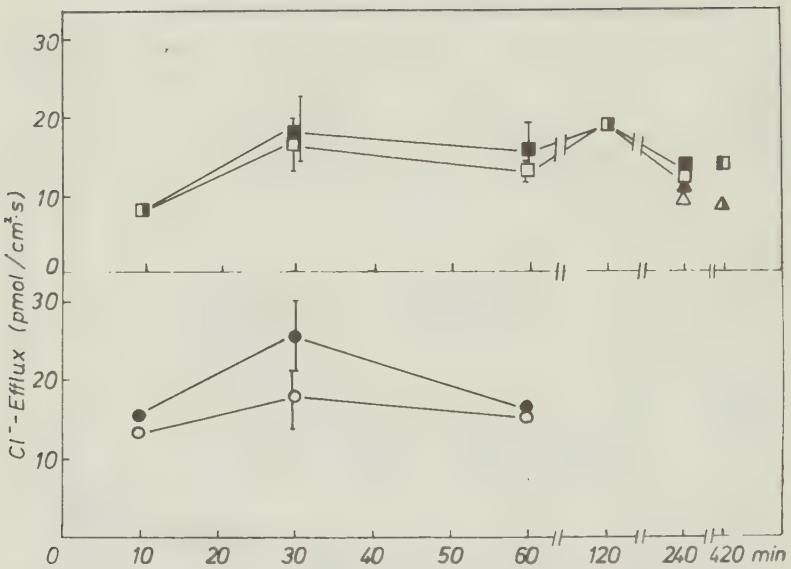


Abb. 33: Abhängigkeit der Cl^- (^{36}Cl)-Flüsse (φ_{oc}, φ_{co}) von 10^{-5} M IAA bzw. 2,4-D bei Zellsuspensionen von PETROSELINUM (4 h Vorinkubation im Experimentalmedium bei pH 4,8). Die Hormonexposition begann 10 - 420 min vor t = 0.
Das Auswaschen mit nichtmarkierten Experimentalmedium (identisch mit dem Inkubationsmedium) begann bei t = 0 (siehe Kasten bei Abb. 31).

4.4. Wirkung von Auxinanaloga und Hemmstoffen der Auxinwirkung auf Flüsse von K^+, Na^+ und Cl^-

NAA wurde als Auxinanalogon gewählt, wobei aber ß-NAA höchstens als schwaches Antiauxin gilt und den IAA-Transport hemmt, im Auxinbindungstest aber stärker als IAA bindet (HERTEL, persönliche Mitteilung). TIBA hemmt den polaren IAA-Transport (HERTEL, 1974 , BATT, 1976, RUBERY und SHELDRAKE, 1974) bzw. die spezifische Auxinbindung im Bindungstest bzw. hemmt den IAA-Efflux. NPA wird sehr schnell an eine vom Auxinrezeptor verschiedene Stelle gebunden (HERTEL, 1974, BATT et al., 1976), diese Inhibition soll aber auf keiner Kompetition mit Auxinen beruhen.

In Tab. 7 wird die Wirkung von α-NAA und ß-NAA, TIBA, NPA mit der Wirkung der IAA und 2,4-D auf Ionenflüsse verglichen.

Tab. 7: Vergleich der Wirkung von NAA, IAA, 2,4-D, NPA und TIBA auf die Ionenflüsse von Na^+ und Cl^- (pmol/cm^2s)

Hormon 10^{-5}M	Hemmstoff bzw. Analogon	φ_{oc} Na	φ_{oc} Cl	φ_{co} Na	φ_{co} Cl	φ_{vc} Na	φ_{vc} Cl
IAA	NPA	2-3	2-4	5-6	2-4	3	0,2
	TIBA	0,3	4-9	0,8	4-9	0,7	0,3
	-	0,5	17	1,0	20	0,4	1,5
2,4-D	NPA	0,35	20-40	1,0	20-40	0,7	0,35
	TIBA	0,4	7-15	0,7	7-15	0,3	0,2
	-	0,5	17	1,0	25	0,2	2
α-NAA	NPA	0,4	8-16	0,6	8-16	0,3	0,2
	TIBA	0,3	50-80	0,5	50-80	0,4	0,3
ß-NAA	NPA	0,2	2-4	0,7	2-4	0,6	0,2
	TIBA	0,25	15-25	0,8	10-25	0,5	0,2

Die NPA- und TIBA-Konzentration war jeweils 5×10^{-6} M, die Applikation der Hormone und Hemmstoffe dauerte 30 - 40 min, die Aufladezeit mehr als 10 h. Der Effekt von NPA und TIBA wurde bisher zumeist bei Transportstudien bei AVENA-Koleoptilen bzw. im spezifischen Auxinbindungstest geprüft (HERTEL, 1969 und 1974). RUBERY et al. (1974) finden unter TIBA-Einwirkung einen geringeren 2,4-D-stimulierten IAA^--Efflux bei crown-gall-Suspensionszellen. Eine Analyse der Wirkungsweise dieser Substanzen auf Influx- und Effluxraten bei Suspensionszellen ist zur Zeit noch nicht möglich.

4.5. Stoffwechselabhängigkeit der Phytohormonwirkungen

Phytohormone steigern die Atmungsrate (Sauerstoffverbrauch in mol O_2 / mg TWxmin) bei Suspensionszellen binnen wenigen min, z.B. erhöht eine Zugabe von 10^{-5} M IAA die Verbrauchsrate um 20 - 40 %, ähnliche Werte gelten auch für 2,4-D. Bei geringen Glucose-Konzentrationen (10^{-5} M) im Medium und nach langerer "Hungerphase" können Phytohormone die Substrataufnahmerate um 10 - 20 % erhöhen, bei Glucose-Konzentrationen von 20 - 80 mM kann dieser Effekt nicht mehr gemessen werden. In Tab. 8 wird die Substratabhängigkeit von Ionenflüssen (Cl^-) dargestellt, Mannitol bzw. Glucose dienten als Substrat und wurden 60 - 90 min vor dem Auswaschen zugegeben. Umfangreichere Untersuchungen über die Substrataufnahmerate, die Wirkungen von Äquilibrierungen in Mannitolmedium und kurz- bzw. langfristige Phytohormonwirkung auf den Substratmetabolismus sind notwendig.

Tab. 8: Cl^--Flüsse in Glucose- bzw. Mannitolmedium (Experimentalmedium) in pmol / cm^2 s

Substrat 80 mM		φ_{oc}	φ_{co}	φ_{vc}
Glucose	-	11-20	11-20	0,06
	IAA 10^{-5} M	17-25	17-25	0,1
	2,4-D 10^{-5} M	25-45	25-45	0,065
	IAA und 2,4-D je 10^{-5} M	16-51	16-51	0,05
	KCN 10^{-4} M	25-38	25-38	0,07
Mannitol	-	5-9	5-9	0,07
	IAA 10^{-5} M	17-25	17-25	0,02
	2,4-D 10^{-5} M	22-27	22-27	0,05
	IAA und 2,4-D je 10^{-5} M	9-23	9-23	0,03
	KCN 10^{-4} M	3-8	3-8	0,03

5.0. Diskussion

5.1. Influx- und Effluxraten der IAA

5.1.1. Aufnahme der IAA

Bei auxanotrophen PETROSELINUM-Suspensionskulturen ist die Proliferationsrate und Stoffwechselaktivität ohne Zusatz von Phytohormonen (IAA, NAA, 2,4-D) und Kinetinen eingeschränkt, diese Hormon-Heterotrophie kann bei Kallus- und Suspensionskulturen nachgewiesen werden (im Konzentrationsbereich von 10^{-5} - 10^{-8} M). Untersuchungen von SEITZ (1970), VASIL et al., (1966), MAHLBROCK (1975) und GUTKNECHT (1976) bestätigen diese Beobachtungen. Anders als bei Mais- und Haferkoleoptilen fehlen bei Suspensionskulturen klare Kriterien für eine Kurzzeit-Hormonwirkung. Die Proliferationsrate als ein Zusammenspiel vieler metabolischer und genetischer Faktoren ist kein zuverlässiger "marker" für schnelle Hormoneffekte auf Ionentransportraten.

Entdifferenzierte pflanzliche Zellen scheinen Phytohormone überwiegend passiv aufzunehmen (Abb. 14, 18, 34 und 35). Auxintransport via Auxinrezeptoren, bei dem IAA kovalent an den Rezeptor gebunden wird (HERTEL, 1974, BATT et al., 1976, HERTEL et al., 1972) oder/und über Carriersysteme (RUBERY et al., 1974) ist damit fast auszuschließen, ein Nachweis über den spezifischen Auxinbindungstest an Plasmamembranen und ER-Membranen dürfte schwierig sein. PETROSELINUM-Suspensionszellen besitzen tatsächlich eine sehr geringe spezifische

Auxinbindung (HERTEL, persönliche Mitteilung) oder diese kann zumindest mit den Trenn- und Nachweismethoden für Bindungstests nicht eindeutig nachgewiesen werden. Aufnahmekinetiken deuten sowohl bei hohen (10^{-5} M) als auch bei niedrigen IAA-Konzentrationen (10^{-9} M) keinen sigmoiden Kurvenverlauf an (Abb. 14), wie es von Sättigungskinetiken in den Bereichen erwartet wird. Kinetin hat bei Kurzzeitkinetiken auf die IAA- und Ionenaufnahme und die Ionenflüsse keinen Einfluß, in allen Experimenten wurde ohne Kinetin gemessen.

Die Transportraten der IAA (10^{-5} - 10^{-8} M) werden überwiegend von IAA_o, den Reaktionskonstanten k_c, k_v, vom pH_o und dem Gradienten IAA^-_c/IAA^-_o bzw. IAA_c/IAA_o bestimmt (Abb. 14 und 18). Unter physiologischen Bedingungen liegt das pH-Optimum der IAA-Wirkungen bei pH 4 - 5, bei hohem pH wird vorwiegend dissoziierte IAA^- im Cytoplasma akkumuliert (pH_c etwa 6 - 7) und undissoziierte IAA passiv aufgenommen (RUBERY et al., 1974).

Zum Vergleich bieten sich Untersuchungen bei Kalluskulturen und Suspensionen anderer Spezies an. Die Daten von Kallus- bzw. frisch suspendierten Kalluskulturen müssen kritisch übernommen werden, denn diese Kulturen können sich in ihrem Ionentransport- und Stoffwechselverhalten, in ihrer Proliferationsrate, Reaktionsbereitschaft auf Phytohormone und in ihrer Morphologie (vgl. Abb. 1, 2) von Suspensionszellen unterscheiden (U. SEITZ, Tübingen, FRITSCH, Freiburg, persönliche Mitteilungen), so daß oftmals direkte quantitative und qualitative Vergleiche nicht zulässig sind. RUBERY et al., (1974) unter-

suchten den Effekt des pH_o, der 2,4-D und TIBA auf IAA-Aufnahmekinetiken bei "crown-gall"-Suspensionen, in der Tab. 9 werden diese Werte mit Daten verglichen, die unter verschieden experimentellen Bedingungen bei PETROSELINUM-Suspensionen gemessen wurden.

Tab. 9 : Kompilation der IAA-Aufnahmeraten (mol / mg TWxh) bei PETROSELINUM- und PARTHENOCISSUS-crown-gall-Suspensionen

IAA-Außenkonz.	Aufnahmerate (pmol bzw. fmol pro mgTWxh)	steady state der Flüsse nach (min) bei PETROS.	Vergleichswerte aus RUBERY et al. (1974)
10^{-5}	± 200 pmol	60 - 120	Aufn. 144 – 500 pmol st. state n. 20 - 60 min,
10^{-6}	16 - 30 pmol	20 - 40	st. state nach 15 min,
10^{-7}	2 - 4 pmol	20 - 30	Umrechnungen nicht möglich, da cpm/mg TW xmin nicht auf h bezogen werden können (S_c^* bzw. Q_c^* wird gemessen)
10^{-8}	0,1-0,22 pmol	10 - 20	
10^{-10}	10 - 20 fmol	10 - 15	

Bei kurzzeitigen Aufnahmen (Messung von S_c^*, Q_c^*) dürfte eine Interferenz des IAA-Metabolismus auf die Aufnahmeraten nicht ins

Gewicht fallen. Bei längerer Hormonexpositionsdauer (länger als 12 - 24 h) wirken IAA-Oxidasen bei der Dekomposition mit, dies trifft bei älteren Zellen bzw. Zellkulturen in der stationären Wachstumsphase zu (EPSTEIN et al., 1975,).

5.1.2. Effluxraten der IAA

Sekretion von IAA wird beim polaren Auxintransport, an dem spezifische Carrier bzw. Rezeptoren beteiligt sind, als energieverbrauchender Prozess angesehen (RUBERY et al., 1974, HERTEL et al., 1969, GOLDSMITH und RAY, 1973). Allerdings muß eine Sekretion von endogener IAA gegen einen Konzentrationsgradienten ("uphill") von einem passiven Efflux unterschieden werden ($IAA_c \gg IAA_o$). PETROSELINUM-Suspensionszellen akkumulieren IAA im Cytoplasma (Tab. 10).
Q_c bzw. Q_v sind von IAA_o abhängig (wenn kein konstanter endogener pool bzw. Gehalt zusätzlich vorhanden ist). Ein IAA-efflux (Φ^*_{ex}) wäre "down-hill" (denn $IAA_c > IAA_o$) ein passiver Vorgang, der auch von der Stöchiometrie IAA^--Influx: IAA^--Efflux abhängt. Die Wirkung von Hormonanaloga und -hemmstoffen auf IAA- und Ionentransportraten könnte durch spezifische Störungen der Stöchiometrie bzw. Veränderung der Gradienten (IAA_c:IAA_v, IAA_c:IAA_o) erklärt werden. Die HWT der IAA betragen bei pH 4,7 - 4,85 und

10^{-5} M IAA_o HWT_c 200 - 240 s, HWT_v 16000 s,
10^{-6} M IAA_o " 200 - 240 s, " 16000 s,
10^{-7} M IAA_o " 200 - 240 s, " 16000 s.

RUBERY et al., (1974) errechneten eine HWT_c von 400 - 500 s

bei Kurzzeitkinetiken; aufgrund fehlender Erläuterungen muß diese Angabe kritisch übernommen werden. Unter der Voraussetzung, daß IAA als ^{3}H-IAA^{-} sowohl beim In- als auch beim Efflux transportiert wird, wurden IAA-Flüsse berechnet, und zwar für den quasi-steady state eines Kompartmentmodells für Ionenflüsse. In Tab. 10 sind Werte von unidirektionalen Flüssen angegeben (30 min Hormonwirkung, pH 4, 7 - 4,8).

Tab. 10: IAA-Flüsse abhängig von IAA_o (in fmol / cm^2 s)

IAA-Konz. in M	φ_{oc}	φ_{co}	φ_{vc}	Q_c mmol/l
10^{-5}	86	87	1,7	0,66
10^{-6}	26	27	0,155	0,145
10^{-7}	1,2	1,21	0,024	0,01

RUBERY et al., (1974) berechneten für IAA_o von 10^{-6} M einen Q_c-Wert von 8×10^{-5} M. Die in Tab. 10 genannten Werte müssen insofern Schätzwerte bleiben, weil der Q_v bei Suspensionszellen mit einer fluorometrischen IAA-Nachweismethode nicht bestimmt werden konnte. Der endogene IAA-Gehalt lag an der Nachweisgrenze des Geräts. Ein passiver IAA-Efflux (angenommen keine Sekretion von IAA und keine Abbauprodukte der IAA werden mitgemessen) ist vom Gradienten IAA_c/IAA_o und pH_c/pH_o abhängig; komplizierter wird eine Analyse durch eine IAA-Kompartimentierung in der Zelle bzw. durch Aktivitätsunter-

schiede infolge von IAA-Bindungen an Säuren, Zuckern etc. in der Vakuole und im Cytoplasma.

5.1.3. Vergleich der Influx- und Effluxdaten

Eine Stöchiometrie der Influx- zu den Effluxraten kann für jede IAA-Konzentration sowie für die IAA-Konzentrationen von 10^{-5} - 10^{-8} berechnet werden (vgl. Abb. 14, 35). Vergleiche: Influx- und Effluxdaten sind gültig, wenn gleiche Hormonexpositionszeiten (30 - 60 min) und etwa gleiche Spezifitäten in den Kompartimenten gewählt werden ($S_c^* = S_o^*$, aber $S_c^* \gg S_v^*$), $Q_T^* = Q_c^*$ gesetzt wird, Vakuolen- zu Cytoplasmavolumen etwa 19:1 beträgt und $\varphi_{co} \gg \varphi_{oc}$ ist. Ein Vergleich Influx- und Effluxdaten für 10^{-6} M IAA_o:

Influxmessungen		Effluxmessungen	
Q_c	0,08 - 0,1	0,145	mmol/l
Q_T	3,5 - 7,8 x 10^{-4}	4 - 5 x 10^{-3}	
Q_v	1 - 3 x 10^{-4}	6 - 12 x 10^{-4}	

Diskrepanzen und Differenzen lassen sich dadurch erklären, daß

- Q_v und Q_c nicht genau berechnet werden können,
- bei Aufnahmeexperimenten S_c^* bzw. Q_c^* infolge Kompartimentierung der IAA zu niedrig gemessen wird,
- eine Kompartmentanalyse für die IAA unzulässig ist

und zu hohe Werte (k_c, k_v, Q_c) erhalten werden.

Bei einer angenommenen passiven Verteilung der IAA in der

Zelle aufgrund der passiven Natur des Transports wäre die Größe der Q_T-Werte aber plausibel (Q_T etwa 1 - 5 x 10^{-6} M, bei IAA_o = 10^{-6} M).

5.2. Gültigkeit der Kompartmentanalyse (3 Kompartimente in Serie) für Suspensionszellen

Pflanzliche Suspensionszellen können in 3 Kompartimente: Zellwand bzw. AFS - Cytoplasma - Vakuole unterteilt werden, mikroskopische Beobachtungen und experimentelle Daten bestätigen dieses Modell. Zwei Membransysteme begrenzen die Kompartimente und bilden Diffusionsbarrieren gegen Ionen, Substrate etc.: das Plasmalemma an der Grenze Außenlösung/Cytoplasma und der Tonoplast an der Grenze Cytoplasma/Vakuole. Ionenflüsse von und zu den Kompartimenten sind bei vielen pflanzlichen Objekten seriale Kinetiken 1. Ordnung in folgender Reihe der Reaktionskonstanten: $k_{afs} \gg k_c \gg k_v$ (CRAM, 1968, WAGNER, 1973, FELLE, 1974, WALKER und PITMAN, 1976). Für die Berechnungen unidirektionaler Flüsse im quasi-steady state gelten unter üblichen experimentellen Bedingungen für pflanzliche Objekte die Differentialgleichungen (4), (5) und (6).
Zuverlassig können diese Gleichungen (d.h. im strengen Sinne der Theorie) nur für den steady state gelöst werden, wenn alle Flüsse, S_c, S_v, Q_c, Q_v konstant sind, die Flüsse serial angeordnet und nicht stöchiometrisch gekoppelt sind und für jedes Ion die Bedingungen $\varphi_{co} = \varphi_{oc}$, $\varphi_{cv} = \varphi_{vc}$ zutreffen.
Der steady state von heterotrophen Systemen wird leicht durch

Stoffwechselaktivitäten, veränderte Kulturbedingungen, hormonelle Effekte und sehr wahrscheinlich durch elektrogene Ionenflüsse gestört, in diesem Fall sind S_c, S_v, Q_c, Q_v, k_c nicht konstant und $\varphi_{co} \neq \varphi_{oc}$, $\varphi_{cv} \neq \varphi_{vc}$, bzw. $J = \varphi_{oc} - \varphi_{co} = \varphi_{cv} - \varphi_{vc}$. J kann von der Hormoneinwirkungsdauer und von der Stoffwechselaktivität abhängig sein.

Eine Abschätzung von Ionenflüssen aus Aufnahmeexperimenten ist gültig, wenn

$$\frac{dQ_c^*}{dt} = \varphi_{oc}S_o + \varphi_{vc}S_v - (\varphi_{co} + \varphi_{cv})S_c \qquad (4)$$

$$\frac{dQ_T^*}{dt} = \varphi_{oc}S_o - \varphi_{co}S_c \qquad (6)$$

und bei Aufnahmeexperimenten biphasische Kinetiken erhalten werden und k_c, k_v berechnet werden können. Ein Nettofluß J sollte noch eine zuverlässige Messung von Q_T erlauben, im quasi-steady state ($S_c = S_o$) sollte $\frac{dQ_T^*}{dt}$ konstant sein. $Q_T = Q_c + Q_v$, d.h. die Summe der 2 exponentiellen Funktionen des Influxes und des Effluxes kann zu einer Zeit t der Aufnahme berechnet werden nach

$$Q_T^* = A(1 - e^{-k\,t}) + B(1 - e^{-k\,t}). \qquad (7)$$

Beim Auswaschen der Zellen ($S_o = 0$) wird

$$Q_T^* = Ce^{-k\,t} + De^{-k\,t}, \qquad (8)$$

$C = A(1 - e^{-k\,t'})$ und $D = B(1 - e^{-k\,t'})$, t' ist die Aufladezeit. Bei kurzen Aufnahme-und Auswaschzeiten wird die Spezifität S_c^* bzw. Q_c^* gemessen, für die Berechnung weiterer Daten geben WALKER und PITMAN (1976) Rechenvorschriften an. Obwohl ex-

perimentelle Daten eine Flußberechnung aus Aufnahmeversuchen ermöglichen, wurden wegen folgender methodischer Überlegungen Effluxexperimente vorgezogen:

- J kann schwanken und negativ sein (bzw. Φ^*_{in}),
- $\frac{dQ^*_c}{dt}$, $\frac{dQ^*_T}{dt}$ sind unter Hormoneinwirkungen nicht konstant (d.h. Störung des quasi-steady state bzw. k_c kann die Synthese mehrerer k_c-Werte sein),
- die Messung von Q^*_c und Q^*_T erlaubt keine Differenzierung von Übergangszuständen von J, S und k in den Kompartimenten für eine bestimmte Ionenspezies,
- die Bestimmung von S^*_v , k_v, Q^*_v erfordert längere Aufnahmezeiten, denn $\varphi_{vc} \gg \varphi_{cv}$ und $\Phi^*_{in} \ll \Phi^*_{ex}$.

5.3. Kompartmentanalyse im quasi-steady state

Für PETROSELINUM-Suspensionszellen sind erhöhte Flüsse von K^+, Na^+ und Cl^- insbesonders unter hormonellen und metabolischen Einwirkungen charakeristisch, schnelle Veränderungen von k_c, Q_c weisen darauf hin. Für Flußberechnungen unter quasi-steady state gelten diese Bedingungen: Q_v, $\frac{dS^*_v}{dt}$ und J sollten für die untersuchten Ionen über längere Zeit konstant bleiben, ebenso sollten die Flüsse zeitunabhängig sein.

Die Berechnung von Q_c hängt von einer zuverlässigen Bestimmung von S^*_c und k_c ab, Q_v ändert sich über die Auswaschzeit sehr gering (da $\varphi_{vc} \ll \varphi_{co}$) und kann trotz eines Nettoeffluxes (Φ^*_{ex}) als konstant angesehen werden, die Bedingungen von Gleichungen (4), (5) und (6) sind

damit erfüllt. Kriteria für veränderte Flüsse unter Hormonwirkungen sind die erhöhten Plasmalemmaflüsse für K^+, Na^+ und Cl^- (vgl. Abb. 26, 27, 31, 32, 33, 34 und 35), vor allem bei kurzen Hormonexpositionszeiten variieren sie mit der Zeit. Aber bereits nach 4 - 7 h ist sowohl für IAA-induzierte Flüsse als auch für Kontrollwerte ein steady state erreicht (vgl. Abb. 24, 25, 31 - 35).

In diesem steady state verändern sich nur gering die Werte von Q_c, Q_v und φ_{cv} [für Cl^- 0,5 - 1,5 pmol/cm^{2}s für IAA (10^{-5}) und Kontrollwerte, für Na^+ 2,5 - 6 x 10^{-2} pmol/cm^{2}s und für K^+ 1,5 - maximal 5 (üblich 1,5 - 3) pmol/cm^{2}s sowohl für IAA- als auch für Kontrollwerte]. φ_{vc} nähert sich nach 120 min Hormonexpositionsdauer dem quasi-steady state.

Eine Flußanalyse bei Hormonexpositionszeiten von 10 - 120 min wird nicht mehr im quasi-steady state sondern im non-steady state durchgeführt, folgende Überlegungen wollen dies begründen:

- Übergangskinetiken treten bei kurzen Expositionszeiten auf (vgl. Abb. 28 - 30).
- k_c, Q_c, φ_{oc}, φ_{co}, φ_{vc} sind abhängig von der Dauer der Hormonexposition und variieren mit der Zeit.
- I_c verändert sich unter Hormonwirkung mit der Zeit und ist ein Indiz für Nettoeffluxe aus dem Cytoplasma.
- Die Bestimmung der apparenten Spezifität S_c^*, bzw. Q_c^* bei Aufnahmekinetiken, bei denen die Hormonexpositionsdauer variiert wurde (Abb. 31 - 33), vgl. Tab. 5 und 6, zeigen ebenfalls nach längerer Hormonexposition eine

relative Abnahme von S_c^*, bedingt durch Nettoeffluxe aus dem Cytoplasma bzw. durch kleinere Flüsse am Plasmalemma.

- k_c und I_c sind eine Synthese von mehreren Einzelkinetiken während der Übergangsphase bei kurzen Hormonexpositionen (vgl. Abb. 29 und 30), die gemessenen k_c, I_c könnten also bei geeigneter Methodik differenziert werden, da aber k_c, I_c die Plasmalemmaflüsse und Q_c wesentlich mitbestimmen, könnten Plasmalemmaflüsse ebenfalls differenziert werden.
- Übergangsphasen für k_v, I_v wurden nicht beobachtet, Experimente belegen auch, daß die Tonoplastenflüsse unter Hormonexposition konstant sind.
- Übergangszustände unter Hormoneinwirkung bewirken einen non-steady state der Plasmalemmaflüsse bzw. des Cytoplasmas aber einen quasi-steady state der Tonoplastenflüsse bzw. der Vakuole; unter diesen Bedingungen sind die steady state-Bedingungen für die Kompartimente und für bestimmte Ionenspezies verschieden.

Eine Kompartmentanalyse konnte dennoch ausgeführt werden, weil die Übergangszustände nur wenige min andauern, die Cytoplasmaphase betreffen und k_c wohl variert, I_c, I_v und k_v bei einer Auswaschdauer von 30 - 40 min noch zuverlässig bestimmt werden können.

Folgende Vorschläge sollen zur Lösung dieser Schwierigkeiten beitragen:

- die Änderungen der Permeabilität und der Leitfähigkeit

für bestimmte Ionenspezies unter kurzzeitiger Hormonexposition müssen Flußmessungen begleiten.

- Es müssen z.B. Auswaschkinetiken (S_o = 0) für die Übergangsphase aufgetragen werden (MUMMERT, GRADMANN, 1976) und aus der Analyse dieser Kinetiken auf Flußveränderungen geschlossen werden (vgl. Abb. 28 - 30).
- Übergangskinetiken der Cytoplasmaphase können durch Polynome bzw. andere Funktionen beschrieben werden und die Faktoren dieser Funktionen (z.B. a_1 - a_n) durch eine Analyse bestimmt werden (.d.h. "Einschwingen" der Flüsse auf eine Reaktion 1. Ordnung nach der Übergangsphase).
- Mathematische Modelle für Flüsse im non steady state müssen in Computer-Simulationen entwickelt und an experimentellen Daten bestätigt werden.

5.4. Vergleich Influx- und Effluxmessungen

In Aufnahmeversuchen wird der AFS binnen 30 s mit 80 ml eiskaltem Waschpuffer vollständig ausgewaschen, aber Q_T^* und Q_c^* nicht wesentlich gemindert. Die Bedingungen für Effluxversuche - eine genügend lange Aquilibration um Effekte des Nachstaus, der veränderten Kulturbedingungen und des Stoffwechsels zu verhindern - erlauben einen Vergleich der Daten aus Influx- und und Effluxmessungen. WALKER und PITMAN (1976) geben diese Rechenvorschriften für Φ_{in}^* an:

$$\Phi^{*}_{in} = \varphi_{cv}\ \varphi_{oc}\ S_o/(\ \varphi_{cv} + \varphi_{co}\ ) \qquad (9)$$

aus Aufnahmemessungen bei sehr kleinem S_v; bei sehr kurzen Aufnahmezeiten wird überwiegend Q^{*}_{c} gemessen und entspricht der Differenz $\varphi_{oc} - \varphi_{co}$ bei $S_c = S_o$.

Gleichung (9) kann durch folgende Rechenvorschrift angenähert werden:

$$\Phi^{*}_{in} = \varphi_{oc}S_o - \varphi_{co}S_c - \Phi^{*}_{ex} \qquad (10)$$

Aus Effluxdaten wiederum kann Q^{+}_{c} bestimmt werden:

$$Q^{*}_{c} = Q_c\frac{(\ \varphi_{oc}S_o + \varphi_{vc}S_v)}{(\ \varphi_{co} + \varphi_{cv})}\ (1 - e^{-k_c\ t}), \qquad (11)$$

Vergleiche wurden unter gleichen Bedingungen (Hormoneinwirkungsdauer, Äquilibrationsdauer, steady state, etc. durchgeführt und Werte für den Zeitraum von 10 x HWT_c abgeschätzt. In Tab. 11 sind Vergleichswerte dargestellt, Influxwerte wurden aus Effluxwerten berechnet (pmol/mg TWxh) bei 60 min Hormonexposition und 1 - 2 h Äquilibrierung.

Tab. 11: Vergleichswerte zwischen Aufnahmeraten (in Klammer) und Influxwerten (aus Effluxwerten berechnet) in pmol/mg TWxh. Die Hormonexposition betrug 1h, die Äquilibrierung 1 - 2 h.

Hormon 10^{-5} M	K^{+}-Aufnahme	Na^{+}-Aufnahme	Cl^{-}-Aufnahme
IAA	40000-60000 (50000)	60 - 100 (50-90)	2000-4000 (1500-3000)
2,4-D	45000-65000 (50000)	50 - 100 (70-80)	3000-9000 (6000-12000)

Deshalb wurden Molaritäten den Aktivitäten gleichgesetzt, bzw. die Aktivitätskoeffizienten bei c_{j-o} und c_{j-i} als gleich betrachtet. Bei längerer Aufladezeit sind frei bewegliche und gebundene Ionen im gleichen Verhältnis markiert, bei Aufnahmemessungen werden überwiegend frei bewegliche Ionen als Tracer gemessen und Q_c^* , Q_T^* bzw. Φ_{in}^* ist zu niedrig.

In früheren Experimenten (PFRÜNER, 1972) wurde eine Kompartmentanalyse unter anderen experimentellen und methodischen Bedingungen durchgeführt: das Kulturmedium mit 10^{-5} M IAA und 10^{-6} M 2,4-D war Inkubations- und Auswaschmedium, die Aufladezeit 14 - 24 h, statt der kontinuierlichen Durchflußmethode wurde eine diskontinuierliche Methode gewählt mit Zeitintervallen der Probenentnahme von 1-2 min in den ersten 10 - 15 min des Auswaschens. Die folgenden Daten belegen eine physiologische Konstanz der PETROSELINUM-Suspensionen (hinsichtlich Transportraten, Phytohormoneffekt, etc.), so daß Daten über längere Zeit hinweg verglichen werden können:

Hormone in M	HWT_{Cl^-} ($^{36}Cl^-$) in s	HWT_{K^+} ($^{86}Rb^+$) in s	
ohne Auxine	260	300	Cytoplasma
10^{-5} IAA 10^{-6} 2,4-D	120 - 180	240	
ohne Auxine	größer als 5100	größer als 4200	Vakuolenphase
Auxine s. oben	5000 - 10000	größer als 3300	

In Tab.12 werden I_c-Werte von Na^+ und Cl^- aus Influx- und Effluxmessungen verglichen, die Hormonexpositionszeit war 10 - 60 min, I_c wurde in pmol / cm^2 umgerechnet, K^+ konnte nicht berechnet werden, weil entsprechende Influxwerte fehlten.

Tab. 12 Vergleich Influx- und Effluxmessungen von Na^+, Cl^- bei einer Hormonexposition von 10 - 60 min

Hormon in M		Exposition min	I_c aus Influx pmol/cm^2	I_c aus Efflux pmol/cm^2
IAA 10^{-5}	Cl^-	10	500 - 1000	800 - 3200
	Na^+		0,6	3,3
	Cl^-	30	70 - 100	100 - 150
	Na^+		1,3	6
	Cl^-	60	140 - 200	90 - 360
	Na^+		1,4	130
2,4-D 10^{-5}	Cl^-	10	50 - 70	1200 - 5000
	Na^+		0,5	70 - 110
	Cl^-	30	90 - 200	180 - 540
	Na^+		0,9	5,4
	Cl^-	60	200 - 400	150 - 500
	Na^+		1 - 2	10

Die Kontrollwerte von I_c aus Effluxversuchen liegen für K^+ bei 500 - 1000, für Na^+ bei 2 - 8 und für Cl^- bei 110 - 260 pmol/cm^2. Die Q_c- bzw. Q_c^*-Werte sind durchweg um eine Größenordnung höher als Φ^*_{in} aus Influxmessungen; das Auswaschen bzw. Abnutschen bei Aufnahmeexperimenten dürfte nicht zu einer solchen Diskrepanz führen. In der Tab. 13 werden Q_c, Q_v und Q_T aus Influx- und Effluxmessungen unter dem quasi-steady state verglichen, während Q_c sehr hoch ist, stimmen die Q_v-Werte mit dem chemisch bestimmten Q_T im wesentlichen überein (Abb. 12). Die unterschiedliche Durchmarkierung bei Efflux- und Influxversuchen, und dadurch unterschiedliche Q_c^*, S_c^* bei kurzen Aufnahmeversuchen spielt sicher mit. Wesentlich dürfte noch der Aktivitätskoeffizient der schwachen und starken Elektrolyte für die jeweiligen Kompartimente sein, denn alle Elektrolyte - vor allem bei hohen Q_c-Werten - liegen im Cytoplasma als Salze vor (Malat, Oxalacetat), die Aktivitäten liegen dann zumeist unter 1. Dieser Gesichtspunkt sollte bei der Berechnung von Flüssen, Permeabilitäten, bei der Berechnung von Diffusionspotentialen und passiven Verteilungen beachtet werden. Es läge damit nicht nur eine Kompartimentierung der Ionengehalte sondern auch eine spezifische Kompartimentierung der Aktivitäten für jedes Ion vor, es müßte zwischen frei beweglichen und teilweise gebundenen Ionen mit unterschiedlicher Spezifität (bei Tracerversuchen) vor allem bei Kurzzeitaufnahmen unterschieden werden, z.B. Q_c^* und S_c^* variiert dann. Aktivitätskoeffizienten bzw. Aktivitäten sind unter diesen physiologischen Bedingungen nicht bekannt.

Tab. 13: Vergleich Q_c, Q_v und Q_T (in mmol/l Cytoplasma- bzw. Vakuolensaft) aus Efflux- und Influxmessungen

Q_c (Efflux)			Q_c (Influx)			Q_v			Q_T		
K^+	Na^+	Cl^-	K^+	Na^+	Cl^-	K^+	Na^+	Cl^-	K^+	Na^+	Cl^-
Kontrolle											
170-	3-	34-	340-	2	68	14-	5-	<0,1-	55-	8	0,3 -
400	13	200	580			40	10	1,0 (1,5)	70		0,7 (1,5)
10^{-5} M IAA											
400-	4-	100-	500	1,5	30	13-	5-	0,1-	55-	8	0,3
1200	9	200 (76)	1100		50	35	10	0,7 (1,0)	112		(1,5)
10^{-5} M 2,4-D											
370-	5-	100-	320	1-	20-	13-	5-	0,1-	67	8	0,3-
400	8	150		2,5	150	40	10	0,3 (0,9)			0,7 (1,5)

Die Cl^--Konzentrationen sind wegen des geringen Vakuolengehalts schwierig zu bestimmen, der Na^+-Gehalt ist relativ konstant und der K^+-Gehalt des Cytoplasmas liegt bei 200 - 400 mmol/l, nur bei einer IAA-Exposition (10^{-5} M) von 30 - 60 min werden 1100 - 1300 mmol/l berechnet (elektrogener Transport?).

5.5. Wirkung von Phytohormonen auf Ionenflüsse

Bei einer Hormoneinwirkungsdauer von 10 - 60 min (10^{-5} M IAA / 2,4-D) werden in den ersten 4 - 6 min des Auswaschens mit nichtmarkiertem Medium Übergangskinetiken der Cytoplasmaphase vor allem für Cl^- und Na^+ beobachtet (Abb. 28 - 30). Diese Übergangskinetiken gehen aber nach 4 - 6 min in eine Kinetik 1. Ordnung über, so daß eine Kompartmentanalyse mit eindeutigen Werten von k_c und k_v berechnet werden kann. Bei einer Exposition (10 min) verändert sich die Reaktionskonstante für Cl^- bei IAA (10^{-5} M) von 2,2 auf $2{,}7 \times 10^{-3}$ s^{-1}, bei 2,4-D (10^{-5} M) von 2,9 auf $3{,}4 \times 10^{-3}$ s^{-1}, bei einer Exposition von 30 min für Cl^- bei IAA und 2,4-D (je 10^{-5} M) von 1,4/1,5 auf 3×10^{-3} s^{-1}, für Na^+ bei IAA von 1,6 auf $3{,}5 \times 10^{-3}$ s^{-1}, die Angaben gelten für k_c-Reaktionskonstanten. Entsprechend müßten auch die I_c-Werte korrigiert (d.h. gemittelt werden) und Flüsse differenziert berechnet werden; als I_c-Werte wurden die entsprechend höheren Werte der eindeutig bestimmbaren Reaktionskonstante k_c gewählt. Diese Übergangskinetiken lassen sich bei Kontrollexperimenten (Abb. 21 - 23) und nach längerer Hormonexposition (60 - 420 min) nicht mehr beobachten (vgl. Abb. 31 - 33). Widersprüchliche Kinetiken bei Aufnahmeexperimenten ließen sich durch Übergangsphasen besonders in den ersten 10 min der Hormoneinwirkung erklären: eine schnelle Zunahme von S_c^*, Q_c^* und nach etwa 40 - 120 min Hormonexposition eine abnehmende Spezifität der Cytoplasmaphase, die nur zum Teil durch einen erhöhten Nettoefflux aus dem Cytoplasma erklärt werden konnte.

5.6. Aktive und passive Transportprozesse

5.6.1. Berechnung der Fluxquotienten nach USSING und TEORELL

Aus den Daten der chemischen Bestimmung von Q_T (Abb. 12) und der Bestimmung von Q_c und Q_v aus Influx- und Efflux-messungen läßt sich folgern, daß Q_c um einige Größenordnungen höher sein kann als c_o aller Ionen, aber Q_v von K^+ etwa K_o^+ entspricht, Na^+ gegen einen Gradienten in die Zellen aufgenommen wird und Cl^- gegen einen Gradienten zumindest aus der Vakuole in das Cytoplasma transportiert wird. Zusammen mit den von GUTKNECHT (1976) mit der Glas-Mikroelektrodentechnik gemessenen Potentialdifferenzen (PD oder E_m) lassen sich aus Flußdaten passive und aktive Anteile an Transportraten von K^+, Na^+ und Cl^- berechnen. Ein Test für passive, unabhängige Diffusion von Ionen über Membranen stellt die USSING-TEORELL-Beziehung dar; für den Quotienten aus Influx und Efflux gilt:

$$\frac{\Phi^*_{in}}{\Phi^*_{ex}} = \frac{a_o}{a_i} \; e^{-zFE_m/RT} \qquad (12)$$

bzw. umgeformt für das gemessene Membranpotential E_m am Plasmalemma bzw. am Tonoplasten:

$$E_m = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{\Phi^*_{in}\; a_i}{\Phi^*_{ex}\; a_o} \qquad (13);$$

anstelle der geforderten elektrochemischen Aktivitäten für

jedes Ion in jedem Kompartiment wurden Molaritäten berechnet, bzw. die Aktivitäten als identisch betrachtet. Der Fluxquotient ist von der Permeabilität der Ionen unabhängig und in diesen Term geht nicht die Größe der Flüsse bzw. die Steigerung der Flüsse unter Phytohormonwirkung ein (vgl. Abb. 26 und 27), da der Fluxquotient ziemlich konstant ist (z.B. bei K^+ und Cl^- 0,94 - 0.98). Wenn der Fluxquotient nicht gleich dem gemessenen und berechneten NERNST-Potential ist , bzw. wenn $\Phi^*_{in} \neq \Phi^*_{ex}$ liegt ein aktiver Transportprozess vor. In Tab. 14 sind aufgeführt: der Quotient aus Influx/Efflux bzw. $\varphi_{oc} : \varphi_{co}$, das berechnete NERNST-Potential für ein bestimmtes Ion und die USSING-TEORELL-Beziehung. Eingeschränkt müssen die Berechnungen insofern, weil für K^+, Na^+ und Cl^- nicht die Aktivitäten für jedes Kompartiment berechnet wurden. Diese Einschränkung gilt für die Q_c-Werte von K^+ und Cl^-, das angenommene Potential E_m Cytoplasma - Außen war - 40 mV, das Potential Cytoplasma - Tonoplast + 5 bis + 10 mV.
Die USSING-TEORELL-Beziehung ("flux ratio kriterion") in Gleichung (12) und (13) wurde nach den Angaben von PIERCE und HIGINBOTHAM (1970) umgeformt und dargestellt.

Tab. 14: Kriteria für aktiven und passiven Transport: gemessene Efflux- "flux ratio" $\Phi^*_{in} : \Phi^*_{ex}$, E_m (NERNST-Potential), sowie USSING-TEORELL-Beziehung (U-T) und Indikation der aktiven (A) und passiven (P) Transporte (Außen-Cytoplasma)

Komp. Außen: Cyt.	Ion	"flux ratio"	$\frac{E_m - E_j}{58}$ mV	U-T-Beziehg. Gl. (13) rechte Seite	Aktiver/ Passiver Transp.
A/C	K^+	0,98 0,96	-0,3 -0,6	-0,9 -1,25	passiver Influx
Kontrolle	Na^+	0,57 0,75	-0,34 -1,0	-0,9 -1,7	aktiver Efflux ?
	Cl^-	0,98 1,0	1,0 2,2	0,75 1,5	aktiver Efflux
IAA 10^{-5}M	K^+	0,94 0,98	-0,6 -1,2	+1,2 -1,8	aktiver Efflux ?
	Na^+	0,6 1,0 0,98	-0,5 -0,9 -0,86	-0,95 -1,5	passiver Influx ?
	Cl^-	0,92 0,96	1,7 2,24	1,27	aktiver Efflux
2,4-D 10^{-5}M	K^+	0,94 0,96	-0,57 -1,14	+1,25	passiver Influx
	Na^+	0,85 0,94	-0,5 -0,86	-1,35 -1,5	aktiver Efflux ?
	Cl^-	0,97	1,9 2,07	1,3 1,4	aktiver Efflux

Fortsetzung von Tab. 14 , für die Berechnungen wurden die Angaben in Tab. 13 zugrunde gelegt. Die folgenden Angaben gelten für die Kompartimente Cytoplasma/Vakuole (vgl. Gl. (13)).

	Ion	"flux ratio"	$\frac{E_m - E_j}{58}$ mV	U-T-Beziehg. Gl. (13) rechte Seite	Aktiver/ Passiver Transport
	K^+	0,33	-0,5	1,0	
		0,5	-1,1	1,9	aktiver Efflux
Kon-	Na^+	0,06	0,14	0,5	
trol-		0,17	-0,52	1,3	aktiver Efflux
le	Cl^-	0,33	-1,5	-2,1	
		0,48	-2,9	-3,1	aktiver Efflux ?
	K^+	0,38	0,7	1,4	
		0,46	1,3	1,8	aktiver Efflux
			2,7	2,3	
IAA 10^{-5}M	Na^+	0,10	0,16	0,3	
		0,26	-0,16	1,0	aktiver Efflux
				1,3	
	Cl^-	0,5	-1,3	-1,8	
			-2,6	-3,3	aktiver Efflux ?
	K^+	0,38	0,75	1,3	
		0,46	1,3	1,8	aktiver Efflux
2,4-D 10^{-5}M	Na^+	0,07	0,12	0,6	
		0,17	-0,22	1,2	aktiver Efflux
	Cl^-	0,5	-1,6	-2,2	
			-2,9	-2,9	aktiver Efflux ?

5.6.2. Berechnung der Permeabilitätskoeffizienten und der relativen Permeabilitäten für K^+, Na^+ und Cl^-

Die bisher angegebenen Daten erlauben die Berechnung von absoluten Ionenpermeabilitätskoeffizienten von unidirektionalen passiven Flüssen (vgl. Tab. 14) nach der GOLDMAN-HODGIN-KATZ-Gleichung (FELLE und BENTRUP, 1976). Diese Gleichung gilt nur, wenn unabhängige, passive Ionenflüsse für das betreffende Ion berechnet werden können. Es soll trotzdem versucht werden, die Permeabilitäten für alle Ionen - auch unter Hormoneinwirkung - annäherungsweise zu berechnen. Permeabilitätskoeffizienten aus φ_{co} bzw. Φ^*_{ex} wurden wegen der hohen Schwankungen von Q_c und E_m nicht berechnet (außerdem müßte $c_{j/i}$ als Ionenaktivität angegeben werden), denn diese beiden Werte gehen als Quotient und Faktor in die Berechnung ein.

In der folgenden Tabelle 15 sind die berechneten Permeabilitätskoeffizienten und die relativen Permeabilitäten für K^+, Na^+ und Cl^- aufgeführt. Während die USSING-TEORELL-Beziehung als Test die aktiven oder passiven Ionentransporte, aber nicht die veränderten Größen der Flüsse erfaßt, wenn die "flux ratio" gleich ist, kann nur mit der GOLDMAN-Nettoflußgleichung (14) eine spezifische Hormonwirkung auf K^+, Na^+ und Cl^- berechnet werden.

PIERCE u. HIGINBOTHAM (1970) geben "flux ratios" und Permeabilitätskoeffizienten für K^+, Na^+ und Cl^- für AVENA-Koleoptilen an. Ihre Schwierigkeit mit der rechnerischen Behandlung von Nettoflüssen und der Disparität der GOLDMAN-Nettofluß-

gleichung könnte mit Alterungsprozessen erklärt werden (MACKLON, 1976, VAN STEVENINCK, 1976). Gewebe akkumulieren in einer Puffer- bzw. Nährlösung mit zunehmender Alterung (12 - 48 h) K^+, Na^+ und Cl^- (MACKLON, 1976).

Die folgenden GOLDMAN-HODGIN-KATZ-Nettoflußgleichungen wurden den Angaben von PIERCE et al. (1970) und FELLE und BENTRUP (1976) entnommen:

$$\varphi_{oc} = - P_j \frac{z_j F E_m}{RT} \frac{c_{j/o}}{1 - \exp\ (z_j F E_m / RT)} \qquad (14)$$

(für eine Ionenspezies j mit einer Konzentration c_o bzw. Aktivität a_o). P_K errechnet sich nach:

$$P_K = - \frac{RT}{F} \varphi_{oc}^K \frac{1 - \exp\ (E_m F/RT)}{K_o^+ \ E_m} \qquad (15)$$

P_K-Werte sind am zuverlässigsten, weil K^+ unabhängig und passiv - im quasi- steady state - transportiert wird (vgl. Tab. 14). Na^+ und Cl^- werden zumeist aktiv transportiert, die Voraussetzungen von Gleichungen (14) und (15) treffen nicht mehr zu, P_{Na} und P_{Cl} sind daher Näherungswerte.

Tab. 15: Permeabilitätskoeffizienten (10^{-6} cm s^{-1}) und relative Permeabilitäten für K^+, Na^+ und Cl^- ($P_K:P_{Na}:P_{Cl}$); berechnet aus φ_{oc} der Abb. 24, 25, 31 - 33 gemäß Gleichungen 14 und 15.

Hormone 10^{-5} M	P_K	P_{Na}	P_{Cl}	relative Permeabilitäten P_K / P_{Na} / P_{Cl}
Kontrolle	0,6 - 2,4	0,8 - 2,5	0,2 - 1,6	1/0,5-1/0,15-0,25
IAA Exposition (min)				
240 -420	0,9 - 2,6	0,6 - 3,6	0,4 - 0,8	1/0,3-1,2/0,35
10	2,5 - 3,3	1,4 - 2,5	0,3 - 0,9	1/0,45/0,1-0,33
30	3,1 - 4,4	1,0 - 1,7	0,5 - 0,8	1/0,3-0,44/0,1
60	3,4 - 4,0	4,8 - 8,7	0,5 - 0,8	1/1,33-2,4/0,1-0,3

Fortsetzung von Tab. 15

Hormon 10^{-5} M	P_K	P_{Na}	P_{Cl}	relative Permeabilitäten P_K / P_{Na} / P_{Cl}
2,4-D Exposition (min)				
10	2,4	2,2 - 3,1	0,5 - 0,7	1/1-1,25/0,25
30	2,1	0,5 - 1,2	0,8 - 1,3	1/0,3-1,2/0,3-0,5
60	2,1	2,5 - 3,7	0,5 - 0,9	1/1,2-1,7/0,2-0,45

5.6.3. Spezifische Wirkung der Phytohormone auf Ionentransporte

Aus Influx- und Effluxexperimenten läßt sich folgende spezifische Wirkung der Phytohormone (IAA und 2,4-D) feststellen: IAA wirkt gegenüber 2,4-D und Kontrollwerten eindeutig auf K^+-Flüsse, im Sinne einer Permeabilitätserhöhung. Für Na^+ läßt sich im Vergleich zu 2,4-D keine eindeutige Spezifität messen. Unter 2,4-D-Exposition werden - im Vergleich zu gleichmolarer IAA - höhere apparente Na^+-Aufnahmen gemessen (BENTRUP et al., 1976). IAA erhöht die Na^+-Flüsse, beide Hormone wirken

nach Expositionen über 60 min auf die Na^+-Transportraten, vor allem 2,4-D scheint die Austauschrate bzw. das Permeabilitätsverhältnis $K^+:Na^+$ spezifisch zu beeinflussen. 2,4-D wirkt gegenüber IAA und Kontrollwerten spezifisch auf die Cl^--Transportraten im Sinne einer Erhöhung von P_{Cl}, dadurch lassen sich die geringeren Aufnahmeraten unter 2,4-D Einfluß erklären, u.U. wirkt 2,4-D im gleichen Sinn auf die IAA-Transportraten (vgl. Tab. 4, 13 - 15 und Abb. 31 - 33).
Für NAA läßt sich noch keine spezifische Wirkung feststellen, Experimente mit Hemmstoffen der Auxinwirkung deuten darauf hin, daß NPA die Kationenselektivität der IAA (Na^+) erhöht und NPA bzw. TIBA die Anionenselektivität der 2,4-D (Cl^-) fördert; die Flußraten am Plasmalemma werden erhöht.

5.7. Mögliche Mechanismen der spezifischen Phytohormonwirkung auf den Ionentransport

5.7.1. Stimulierung der membrangebundenen Kationen-ATPasen durch Phytohormone

HAGER et al. (1971) postulierten, daß IAA der Effektor einer membrangebundenen (Kationen)-ATPase sei, die einen stöchiometrischen Austausch K^+/H^+ bewirkt, IAA induziert auch eine K^+-Aufnahme bzw. H^+-Extrusion im Verhältnis 1:1 (HASCHKE u. LÜTTGE, 1976, CLELAND, 1976, RAYLE, 1976). In pflanzlichen Plasmamembranen wurden auch kationen- und anionensensitive ATP-asen gefunden (HODGES, 1976), die Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} als

Cofaktor zur Stimulation ihrer Aktivität benötigen . Zusammen mit zweiwertigen Ionen als Cofaktoren wird die ATPase-Aktivität durch monovalente Kationen stimuliert (K^+, Na^+). Bisher wurde noch keine IAA-stimulierte ATPase-Aktivität in der Plasmamembran nachgewiesen. Die nicht metabolisierbaren Substrate (Mannitol) und Cyanid (KCN 10^{-4} M) (vgl. Tab. 7 und 8) verringern die Effluxrate je nach der Dauer der Vorinkubation um 50 - 60 %; die Sauerstoffverbrauchsrate wird durch IAA binnen min ebenfalls beeinflußt (20 - 30 % Steigerung durch 10^{-5} M IAA). Diese Beobachtungen deuten auf energieverbrauchende Vorgänge hin, die von der IAA induziert werden. Andererseits weisen die Kinetiken der IAA-Aufnahme- und Effluxraten (vgl. Abb. 14 und 35), sowie die Dosis-Effekt-Relationen der Cl^-- und K^+-Flüsse - jeweils abhängig von der IAA-Außenkonzentration - auf z.T. passive stöchiometrische Vorgänge hin. Die IAA-Aufnahmerate wird im Bereich 10^{-5} - 10^{-8} M IAA_o nicht abgesättigt. Die Stöchiometrie IAA-Aufnahmerate (mol /cm^2s) zur ^{3}H-IAA-Effluxrate (mol /cm^2s) bzw. zum Q_c-Wert (mol /cm^2) beträgt etwa 10^{-2} (Abb. 35). Die Stöchiometrie K^+- bzw. Cl^--Effluxrate zur IAA-Außenkonzentration bzw. IAA-Aufnahmerate (mol /cm^2s) beträgt etwa (Abb. 34):
bei K^+ (10^{-6} - 10^{-8} M IAA) $4x10^6$, bei 10^{-6} - 10^{-4} M IAA etwa $9x10^5$, die entsprechenden Werte für Cl^- liegen bei $1,8x10^6$ bzw. $5x10^5$, (Influx- und Effluxraten in mol /cm^2s).

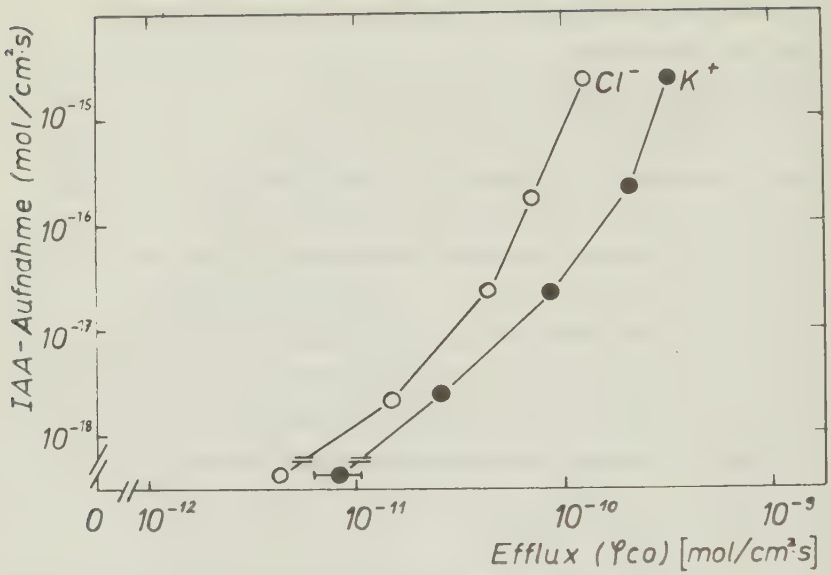


Abb. 34: Abhängigkeit der Effluxraten (φ_{co}) von K^+ und Cl^- von der IAA (^{3}H-IAA)-Influxrate, die jeweiligen Werte bei gleichen IAA-Außenkonzentrationen wurden einander zugeordnet. Zusammenfassung aus Abb. 27, 28, 14 und Angaben im Text unter 5.1.
Die IAA-Influxrate von etwa 10^{-15} mol cm^{-2} s^{-1} entspricht einer IAA-Außenkonzentration von 10^{-5} M.
Die Bedingungen der Influx- und Effluxdaten sind vergleichbar (Aquilibrations- und Hormonexpositionszeit, gleiches Experimentalmedium, homogene Zellsuspension etc.).

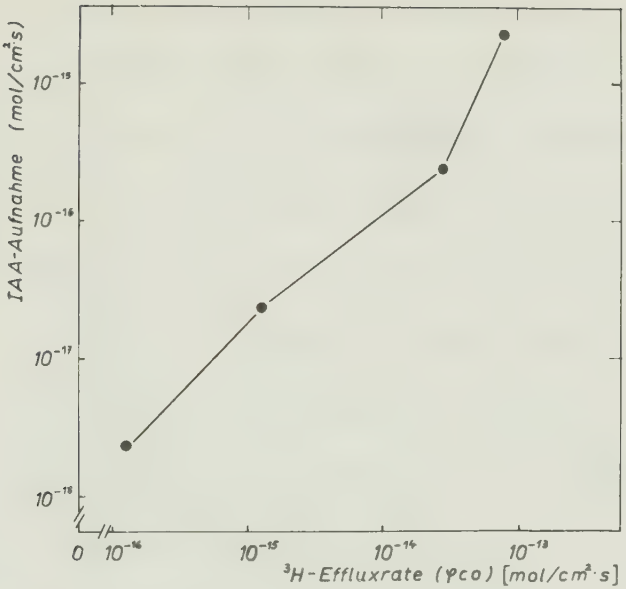


Abb. 35: Abhängigkeit der IAA (^{3}H-IAA)-Effluxrate von der IAA-Influxrate, es wurden vergleichbare Bedingungen gewählt. Die Daten sind zusammengestellt aus Abb. 14 und aus Angaben in 5.1.

Die geforderten ATPasen müßten einen hohen K_m-Wert haben (über 1 mM) und eine Stöchiometrie der Ionentransportraten über einen weiten Konzentrationsbereich des "Effektors" aufrechterhalten können. Ein ATPasen-abhängiger K^+/H^+-Transport (H^+-Extrusion) kann bei den untersuchten Zellsuspensionen nicht postuliert werden, weil ein spezifischer Protonentransport nicht untersucht wurde. Es besteht aber kein Widerspruch zu der von HAGER et al. (1971) geforderten IAA-stimulierten H^+-ATPase am Plasmalemma. Die erhöhten P_K-Werte könnten auf die Aktivität plasmamembrangebundener H^+- bzw. K^+-ATPasen hinweisen, die den energieabhängigen K^+-H^+-Austausch, bzw. die H^+-Exkretion, stöchiometrisch und elektrochemisch balancieren. 2,4-D könnte die Aktivität einer am Tonoplasten lokalisierten Cl^-- (bzw. Anionen) ATPase stimulieren (vgl. Tab. 13 - 15, Abb. 29 - 34) oder die IAA-stimulierte ATPase kompetitiv oder antagonistisch hemmen.

5.7.2. Veränderungen der elektrischen Eigenschaften und/oder der Struktur der Membran

Naheliegende Erklärungsmöglichkeiten der Phytohormonwirkung sind erleichterte Diffusion bzw. erleichterte Austauschdiffusion z. B. von K^+/H^+, danach könnten Phytohormone die Membranen löcherig machen und über "Membranporen" (LÄUGER, 1973) spezifisch auf den Ionentransport wirken. Eine andere Möglichkeit ware eine hormoninduzierte Aktivierung von "Carriern", die wiederum ionenselektive Prozesse in Gang setzen. Auszuschließen wäre eine ionophore Wirkung der Phytohormone analog zur Wirkung der Valinomycin-Analoga (Makrotetralide), der Nigericin-Analoga

und der Alamecithine bei Bakterien- und Mitochondrienmembranen nicht. Ionophoren stimulieren den K^+-Influx in Wurzeln (HODGES, 1971), es könnte auch ein unspezifischer Membraneffekt in der erwähnten Arbeit vorliegen, da ionophore Substanzen zumeist in hohen Konzentrationen (10^{-3} M) verwendet werden. Das von COSTER (1965) postulierte und teilweise experimentell bestätigte "double fixed charge membrane model", bei dem die Membran als n-p-Halbleiter funktionieren soll, bietet ebenfalls Erklärungsmöglichkeiten für die ionenselektive Wirkung von Phytohormonen. Die positiven bzw. negativen Festladungen der Membran könnten durch Phytohormone spezifisch verlagert werden bzw. das Potential der Übergangsregion verringern oder vergrößern. Die Gesamtkapazität der Membran bzw. die Spezifität der Membran für Anionen und/oder Kationen und dadurch auch Ionentransportprozesse könnten sich verändern und andere Stöchiometrien bewirken.

Sehr herzlich danke ich Prof. Dr. F. W. Bentrup für die Betreuung und für anregende, weiterführende Gespräche während dieser Arbeit. Allen Kolleginnen und Kollegen der Abt. Biophysik, des Instituts für Biologie I, der Institute für Mikrobiologie I und II, des Isotopenlabors, insbesondere Dr. Altendorf, Tübingen, Prof. Dr. R. Hertel, Freiburg, Dr. D. Gradmann, Tübingen, Prof. Dr. C. L. Slayman, Yale University danke ich vielmals für Chemikalien und wertvolle Hilfe für meine Untersuchungen.

6.0. Zusammenfassung

1. Die Parameter einer diskontinuierlichen, axenischen Kultur von PETROSELINUM-Suspensionszellen wurden bestimmt (Veränderungen des Trockengewichts, des pH, der Leitfähigkeit, der intrazellulären Ionenkonzentration, etc.), um eine Standardisierung der Kulturen für Membrantransportexperimente zu erzielen.

2. Die passive Aufnahme von ^{3}H-Indolessigsäure (IAA) verhält sich stöchiometrisch zur IAA-Außenkonzentration (ca. 2×10^{-10} bis 2×10^{-13} mol/mg TWxh bei 10^{-5} bis 10^{-8} M IAA). 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) verringert die IAA-Aufnahme.

3. Bei allen Flußanalysen bleibt das Verhältnis Influx/Efflux unter Hormoneinwirkung konstant (vgl. Abb. 31 - 33, Tab. 14). Die Konzentration der Hormone und ihre Expositionsdauer erhöhen die Größe der Flüsse (Dosis-Effekt-Relation in den Abb. 26, 27 und Abb. 31 - 33). Die Bedingungen der Kompartmentanalyse waren im non-steady state (Abb. 28 - 30) und im quasi-steady state (Abb. 21 - 23) gültig.

4. Es wurden folgende Plasmalemmaflüsse (φ_{oc} und φ_{co} in pmol/cm^{2}s) bei Experimenten ohne Hormone gemessen (vgl. Abb. 21 - 23), für K^+ (^{86}Rb) zu 30 - 60, für Na^+ (^{22}Na) zu 0,5 - 1 und für Cl^- (^{36}Cl) zu 10 - 20. Unter einer IAA-Exposition (10^{-5} M) konnten folgende - zu obigen Kontrollwerten zugehörige - Flüsse (vgl. Abb. 28 - 30) gemessen werden: für K^+ zu 75 - 100, für Na^+ zu 0,7 - 1,5 und für Cl^- zu 17 - 35 pmol/cm^{2}s.

5. Bei einer Hormonexposition (10^{-5} M IAA bzw. 2,4-D) von 10 - 60 min konnten kurzfristige Übergangskinetiken der Cytoplasmaphase für Na^+ und Cl^- beobachtet werden (Tab. 5, 6 und Abb. 29, 30). Unidirektionale Flüsse während dieser Übergangsphase (non-steady state) wurden für K^+, Na^+ und Cl^- in allen Kompartimenten berechnet (Abb. 31 - 33). IAA wirkt insbesonders auf die Flußraten von K^+ und Na^+ (100 - 200 % Erhöhung), 2,4-D erhöht die Cl^--Flüsse.

6. Bei längeren Hormonexpositionen (2 - 7 h) treten Übergangskinetiken (Abb. 21 - 23, Tab. 6) nicht mehr auf (quasi-steady state). Die Flüsse nähern sich den Kontrollwerten (Abb. 31 - 33 , 24, 25).

7. Unter IAA-Exposition (10^{-5} bis 10^{-8} M) werden die Aufnahmeraten von K^+, Na^+ und Cl^- gegenüber den Kontrollwerten verringert (Tab. 3). 2,4-D senkt die Cl^--Aufnahme und erhöht die Na^+-Aufnahme (Abb. 20). Die erhöhten Plasmalemmaflüsse von K^+ und Cl^- stehen in einer Stöchiometrie zur IAA-Aufnahmerate (Abb. 34).

8. Berechnungen der aktiven und passiven Flüsse nach USSING und TEORELL zeigten (Tab. 14), daß K^+ zumeist passiv über Plasmalemma und Tonoplast transportiert wird. Bei Na^+ liegt ein aktiver Influx in das Cytoplasma und ein aktiver Efflux aus der Vakuole vor. Cl^- könnte überwiegend aktiv aus dem Cytoplasma und

aus der Vakuole geschleust werden. Auxine verändern dieses aktive bzw. passive Transportverhalten nicht grundlegend. Ihre Wirkung auf die Ionenflüsse kann durch variable Permeabilitätskoeffizienten beschrieben werden (Tab. 15).

9. Diese Ergebnisse sind mit der Hypothese von HAGER et al., (1971) zur Primärwirkung des Auxins gut vereinbar. Die IAA-stimulierte H^+-Extrusion am Plasmalemma kann sekundär über passive Diffusion bzw. Cotransportsysteme die K^+-, Na^+- und Cl^--Flüsse verändern. Die unterschiedliche Wirkung von 2,4-D legt aber nahe, daß mit wenigstens einem weiteren Angriffspunkt für Auxine am Plasmalemma gerechnet werden muß.

7.0. Literaturverzeichnis

Anderson, L. E., McClure, W. O. — An improved scintillation cocktail of high-solubilizing power, Anal. Biochem. 51, 173 - 179 (1973),

Batt, S., Wilkins, M. B., — Auxin binding to corn coleoptile membranes: kinetics and specifity, Planta (Berl.) 130, 7 - 13 (1976),

Bentrup, F. W., Pfrüner, H., Wagner, G., — Evidence for differential action of indoleacetic acid upon ion fluxes in single cells of PETROSELINUM sativum, Planta (Berl.) 110, 369 - 372 (1973),

Bentrup, F. W., Gutknecht, W., Pfrüner, H., — Auxin effects on the ionic relations of PETROSELINUM cell cultures, in press,

Bergmann, L., Grosse, W., Koth, P., — Einfluß von Ammonium und Nitrat auf Stickstoff-Metabolismus, Malatanhäufung und Malatenzym-Aktivität in Suspensionskulturen von NICOTIANA tabaccum var. "SAMSUN", Z. Pflanzenphysiol. Bd. 80, S. 60-70, 1976,

Butcher, D. N., Sogeke, A. K., Tommerup, I. C., — Factors influencing changes in ploidy and nuclear DNA levels in cells from normal, crown-gall and habituated cultures of HELIANTHUS annuus L., Protoplasma 86, 295 - 308, 1975,

Cleland, R. E., — Kinetics of hormone-induced H^+-excretion, Plant. Physiol. Vol. 58, 210 - 213, 1976,

Coster, H. G. L. — A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through", Biophys. J. 5, 669 - 686 (1965),

Cram, W. J., — Compartimentation and exchange of chloride in CARROT tissue, Biochim. Biophys. Acta 163, 339 - 353 (1968),

Epstein, E., Klein, I., Lavee, S., — Uptake and fate of IAA in apple callus tissues: metabolism of IAA-2-^{14}C, Plant & Cell Physiol. 16, 305 - 311, (1975),

Felle, H., — Analyse der lichtinduzierten Membranpotentiale bei RICCIA fluitans, Diss. 1974, Universität Tübingen,

Felle, H., Bentrup, F. W., — Effect of light upon membrane potential, conductance, and ion fluxes in RICCIA fluitans, J. Membrane Biol. 27, 153-170 (1976),

Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K., — Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells, Exp. Cell Res. 50, 151 - 158, (1968),

Gamborg, O. L., Shyluk, J. P., — The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source, Plant Physiol. (1970) 45, 598 - 600,

Goldsmith, M.H.M., Ray, P. M., — Intracellular localisation of the active process in polar transport of auxin, Planta (Berl.) 111, 297 - 314, (1973)

Gould, A. R., Bayliss, M. W., Street, H. E., Studies on the growth in culture of plant cells XVII. Analysis of the cell cycle of asynchronously dividing ACER pseudoplatanus L. cells in suspension culture, J. exp. Bot., Vol. 25, No. 85, 468 – 78, (1974),

Gutknecht, W., Elektrophysiologische Untersuchungen zur Frage der Auxin-Primärwirkung an heterotrophen Zellkulturen von PETROSELINUM sativum Hofm., Dissertation 1976, Tübingen,

Hager, A., Menzel, H., Krauss, A., Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. Planta (Berl.) 100, 47 - 75 (1971),

Hahlbrock, K., Kuhlen, E., Relationship between growth of PARSLEY and SOYBEAN cells in suspension cultures and changes in the conductivity of the medium. Planta (Berl.) 108, 271 - 276 (1972),

Hahlbrock, K., Further studies on the relationship between the rates of nitrate uptake, growth and conductivity changes in the medium of plant cell suspension cultures. Planta (Berl.) 124, 311 - 316 (1975),

Haschke, H.-P., Lüttge, U., Stoichiometric correlation of malate accumulation with auxin-dependent K^+-H^+ exchange and growth in AVENA coleoptile segments. Plant Physiol. (1975) 56, 696 - 698,

Haschke, H.-P., Lüttge, U., Auxin action on K^+-H^+-exchange and growth, $^{14}CO_2$-fixation and malate accumulation in AVENA coleoptile segments, in press, Elsevier,

Hertel, R., Evans, M. L., Leopold, A. C., Sell, M. H., The specifity of the auxin transport system. Planta (Berl.) 85, 238 - 249 (1969),

Hertel, R., Thomson K.-St., Russo, V. E. A., In-vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. Planta (Berl.) 107, 325 - 340 (1972),

Hertel., R., Auxin transport and in vitro binding. In: Membrane transport in plants. Zimmermann, U., Dainty, J., (Eds.) pp 457-461, Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 1974,

Hodges, T. K., Darding, R. L., Weidner, I., Gramicidin-D stimulated influx of monovalent cations into plant roots. Planta (Berl.) 97, 245-256 (1971),

Hodges, T. K., ATPases associated with membranes of plant cells. In: Transport in plants II Part A Cells, ed. by Lüttge, U., Pitman, M. G., pp. 260 - 281, Encyclopedia of plant physiology, New Series, Vol. 2, Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 1976,

Hope, A. B., Ion transport and membranes. A biophysical outline, Butterworth, London, 1971,

Jones, L. H., Barret, J. N., Gopal, P.P., Growth and nutrition of a suspension culture of POGOSTEMON cablin Benth. (patchouli), J. exp. Bot., Vol. 24, No. 78, 145 - 158, (1973),

Kanne, R., Untersuchungen zum Kaliumgehalt von STREPTOMYCES griseus und einer makrotetralid-negativen Mutante, Dissertation 1974, Tübingen,

Lado, P., de Michealis, M. I., Cerana, R., Marre, E., Fusicoccin-induced, K^+-stimulated Proton secretion and acid-induced growth of apical root segments, Plant Sci. Let. 6 (1976) 5 - 20,

Läuger, P., Ion transport through pores: a rate-theory analysis. Biochim. Biophys. Acta, 311, 423 - 441 (1973),

Macklon, A. E. S., An examination, by compartmental flux analysis, of the development of sodium and chloride absorption capacities in beetroot disks. J. exp. Bot., Vol. 27, No. 99, 651 - 657, (1976),

Mummert, H., Gradmann, D., Voltage dependent potassium fluxes and the significance of action potentials in ACETABULARIA, Biochim. Biophys. Acta, 443 (1976) 443 - 450,

Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473 - 497 (1962),

Pfrüner, H., Untersuchung von K^+- und Cl^--Flüssen, insbesondere deren Abhängigkeit von Indolessigsäure, an Zellkulturen von PETROSELINUM sativum, Diplomarbeit 1972, Tübingen,

Pierce, W., Higinbotham, N., Compartments and fluxes of K^+, Na^+ and Cl^- in AVENA coleoptile cells. Plant Physiol. (1970) 46, 666 - 673,

Pitman, M. G., The determination of the salt relations of the cytoplasmic phase in cells of beetroot tissue. Australian J. Biol. Sci. 16, 647 - 668 (1963),

Pressman, B. C., Properties of ionophores with broad range cation selectivity. Federation Proc. 32, 1698 - 1703 (1973),

Raven, J. A., Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. New Phytologist 74, 163 - 172 (1975a),

Rayle, D. L., Auxin-induced hydrogen-ion secretion in AVENA coleoptiles and its implications. Planta (Berl.) 114, 63 - 73 (1973),

Rose, D., Martin, S.M., Parameters for growth measurements in suspension cultures of plant cells. Can. J. Bot. 52, 903 - 912 (1974),

Rubery, P. H., Sheldrake, A. R., Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin. Nature New Biol. 244, 285 - 288, (1973),

Rubery, P. H., Sheldrake, A. R., Carrier-mediated auxin transport. Planta (Berl.) 118, 101-121 (1974),

Schultz, G. S., Solomon, A. K., Cation transport in ESCHERICHIA coli I. Intracellular Na^+ und K^+ concentrations and net cation movement. J. Gen. Physiol., 45, 355-369 (1961),

Seitz, U., Charakterisierung schnellmarkierter hochmolekularer RNS bei sterilen Zellkulturen von PETROSELINUM sativum. Diss. 1970, Universität Tübingen,

Smith, S. M., Street, H. E., The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (DAUCUS carota L.) are serially subcultered. Ann. Bot. 38, 223 - 41, (1974),

van Steveninck, R. F., Effect of hormones and related substances on ion transport, in: Encyclopedia of Plant Physiology New Series, Vol. 2B, pp. 307-328, ed. Lüttge, U., Pitman, M.G., Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1976,

Syono, K., Furuya, T., Studies on plant tissue cultures I. relationship between inocula sizes and growth of calluses in liquid culture. Plant & Cell Physiol., 9, 103 - 114 (1968),

Thomson, K.-St., Hertel, R., Muller, S., Tavares, J.E., 1-N-naphthylphthalamic acid and 2,3,5-triiodobenzoic acid. In vitro binding to particulate cell fractions and action on auxin transport in corn coleoptiles. Planta (Berl.) 199, 337 - 352 (1973),

Thellier, M., Thoiron, A., Le Guiel, J., Guern, J., A shock effect on the permeability to sulphate of ACER pseudoplatanus cell suspension cultures; in press,

Vasil, I. K., Hildebrandt, A. C., Growth and chlorophyll production in plant callus tissues grown in vitro. Planta (Berl.) 68, 69 - 82 (1966),

Wagner, G., Fluxes and compartmentation of potassium and caloride in the green alga HOUGEOTIA. Planta (Berl.) 118, 145 - 157 (1974),

Walker, N. A., Pitman, M. G., Measurement of fluxes across membranes, in: Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol. 2A, pp. 93 - 124, ed. Lüttge, U., Pitman, M.G., Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1976)

Zimmermann, U., Pilwat, E., Untersuchungen über den K^+-Transport bei ESCHERICHIA coli. Z. Naturforsch. 26b, 887 - 893 (1971).

7.0. Lebenslauf

Name:	P f r ü n e r , Helmut Karl
Geburtstag:	3. Mai 1943
Geburtsort:	7411 Reutlingen-Sondelfingen
Eltern:	Karl Pfrüner und Maria Pfrüner geborene Kehrer
1949 - 1957	Volksschule Reutlingen-Sondelfingen
1957 - 1960	Höhere Handelsschule Reutlingen
1960 - 1963	Theodor-Heuss-Schule Reutlingen
20.3.1963	Reifeprüfung Wirtschaftsoberschule Reutlingen
1963 - 1965	Kaufmännische Lehre in Reutlingen
1965 - 1966	Sprachenkolleg der Evang. Landeskirche Stuttgart
26.4.1966	Ergänzungsprüfungen zur Reifeprüfung in Latein (Grosses Latinum) und in Griechisch (Graecum)
SS 1966 - SS 1968	Universität Tübingen (Biologie/Evang. Theologie)
WS 1968/69 - SS 1969	Universität Hamburg (Biologie/ Evang. Theologie)
WS 1969/70 - SS 1972	Universität Tübingen (Biologie/Evang. Theologie)
3.3.1969	Diplomvorprüfung in Biologie
18.8.1972	Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien (Biologie/Evang. Theologie)
12.12.1972	Diplomprüfung in Biologie (Botanik, Zoologie, Genetik, Pharmakologie)
1972 - 1973	Studienreferendar (Studienseminar Tübingen)
6.12.1973	Pädagogische Prüfung für das Lehramt an Gymnasien (Biologie/Evang. Theologie)
September 1973 - Juli 1974	Studienassessor in Friedrichshafen
August 1974 - Oktober 1974	Wissenschaftlicher Angestellter (aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft) bei der Abteilung Biophysik der Pflanzen am Institut für Biologie I an der Universität Tübingen
	In dieser Zeit fertigte ich vorliegende Dissertation unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. F.W. Bentrup an.

Akademische Lehrer waren die Herren Professoren

in den Naturwissenschaften:
Bayer, Bentrup, Bünning, Caspers, Drawert, Gierer, Grell, Hausen, Krüger, Kulzer, Mägdefrau, Metzner, Möhres, E. Müller, Mundry, Rüdorff, Schmitz, Schwartz, Schweizer, Schwemmle, Seyffert, Weidner, Zähner, Zetsche,

in der Theologie:
Ebeling, Käsemann, Kroeger, Lohff, Lohse, Michel, Moltmann, Scharffenberg, Scholder, Thielicke, Wilckens.